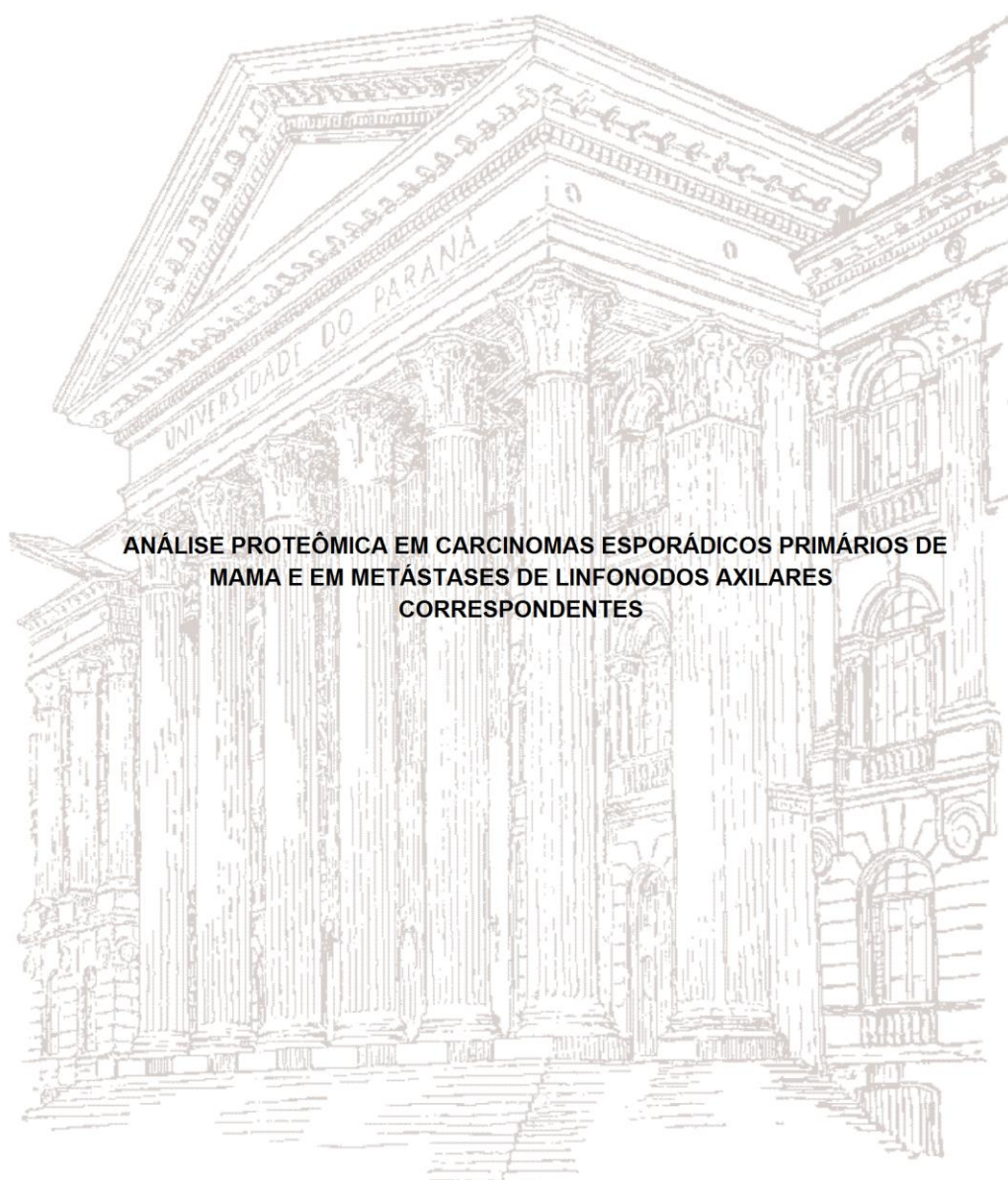


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

KARLA SANTOS SOUSA



**ANÁLISE PROTEÔMICA EM CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE
MAMA E EM METÁSTASES DE LINFONODOS AXILARES
CORRESPONDENTES**

**CURITIBA
2013**

KARLA SANTOS SOUSA

**ANÁLISE PROTEÔMICA EM CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS
DE MAMA E EM METÁSTASES DE LINFONODOS AXILARES
CORRESPONDENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza
Fonseca Ribeiro

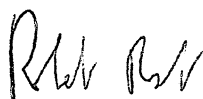
**CURITIBA
2013**

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **KARLA SANTOS SOUSA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

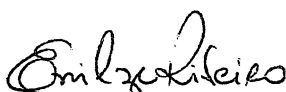
Curitiba, 24 de abril de 2013



Doutor Roberto Rosati
Instituto Pelé – Pequeno Príncipe – Membro Titular



Doutor Márcio Marques de Moraes
Faculdades Metropolitanas Unidas – Membro Titular



Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



Prof^º Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

DEDICATÓRIA

“... uma das coisas que aprendi é que se deve viver ‘apesar de’. ‘Apesar de’, se deve comer. ‘Apesar de’, se deve amar. ‘Apesar de’, se deve morrer. Inclusive muitas vezes é o próprio ‘apesar de’ que nos empurra para a frente...” Apesar da sua falta, eu tive e tenho que continuar, mesmo que esta falta esmague meu coração. Sempre me lembro do seu sorriso... dos seus olhos ... do seu carinho ... e do seu amor ... e isso levarei comigo onde quer que eu vá ... me lembro principalmente da sua luta e lembro do dia que te perdi ... mas tudo que vivemos estará para sempre gravado em meu coração ... Obrigada por todo amor que tive, todo apoio e torcida ... Gostaria que estivesse aqui comigo comemorando mais uma vitória ... TE AMO eternamente ... Dedico este trabalho a minha avó querida e a todas as mulheres que lutam contra o câncer de mama e que em muitos casos perdem esta batalha ... Dedico a todas as famílias que veem seus entes queridos partirem ... Saudades imensas ...

AGRADECIMENTO

Mais uma etapa vencida. Quantas lembranças, lágrimas, sorrisos, aprendizados, derrotas, e principalmente, vitórias. Olhando pra trás vejo o quão grata sou por enfim realizar mais um sonho.

Em primeiro gostaria de agradecer a minha família, sem o qual não teria chegado tão longe... e quão longe estou deles, mas o apoio, o amor incondicional sempre foi tão grande quanto essa distância.

A minha mainha, minha amada, minha vida, minha luz, que acompanhou toda a minha trajetória, sofrendo e vibrando, consolando, confortando... a você dedico toda essa luta e principalmente essa vitória. Obrigada por permanecer a meu lado apesar de tudo ... dos meus sonhos que sempre me levam para longe ... obrigada por sempre embarcar em todas as minhas loucuras. Obrigada pela paciência. Obrigada por tudo o que sou e por tudo o que tenho ... você foi quem me ensinou a sonhar e principalmente a lutar por eles ... obrigada pela força que sempre vejo em você... se mil vidas eu tiver, em todas elas quero ter o privilégio da sua presença em minha vida... AMO-TE.

Ao meu irmão, meu amor, minha vida ... por toda a parceria, apoio, carinho, paciência. Você é o melhor irmão do mundo e saber que você existe, sempre me fez e faz mais forte, porque sei que posso sempre contar com você. A distância em nada diminuiu a admiração e respeito que tenho por você. Obrigada por simplesmente existir.

Ao meu painho, pelo jeito amoroso que sempre me tratou... por ser sua filhinha sempre e em qualquer situação, porque sempre me sinto a mesma menina que corria para você querendo colo ... e sei que ele está aí incondicionalmente.

As minhas tias Nilda e Roseli, minhas outras mães, pelo apoio, amor, força, risadas. Por estarem sempre ao meu lado ... por vibrarem junto comigo e por me consolarem a cada tristeza, decepção, derrota ... Às minhas primas e primos lindos que fazem da minha vida mais alegre e agitada. A Livia, minha bonequinha que veio para trazer muita alegria a minha vida... A titia te ama muito minha princesinha ...

Amo vocês até o limite do meu entendimento ...

Aos meus amigos que mais uma vez ficaram na torcida e na saudade... Minha tchonguinha (Marta), minha pretinha (Cláudia) ... amo vocês demais e sinto falta todos os dias.

Aos amigos que aqui recebi. A Débora e toda sua família que me acolheu tão bem. A minha Buh (Bruna) pela sua presença iluminadora em minha vida ... A Juliana pela amizade, por cuidar tão bem de mim quando eu precisei e principalmente quando não precisei. Felipe pelas risadas. Vocês tornaram minha caminhada muito mais divertida.

A Dellyana, pelos conselhos, comidas, ombro, colo, risadas, enfim ... simplesmente por estar aqui ... Obrigada por sua amizade, que hoje me é tão preciosa.

A Lorrhenn, por fazer da minha vida melhor. Obrigada até pelas turbulências, desavenças, com elas também aprendi. Obrigada por toda leveza, doçura, meiguice que você trouxe a minha vida, me ensinado a ser um pouquinho mais doce também. Obrigada pelo colo, vinhos, comidinhas, alegria, e principalmente pelos ouvidos, pelos conselhos e todo apoio em todos os momentos que mais precisei ... eu serei eternamente grata por tudo isso. Meu mais profundo MUITO OBRIGADA.

A André que chegou nos minutos finais do segundo tempo, mas que me mostrou que ainda existem pessoas com bondade no coração. Conviver com você é um privilégio. Obrigada.

A Helder, meu filhote lindo que amo muitão, que caiu de paraquedas e transformou minha vida. Meu amigo, irmão, filho, parceiro ... Obrigada pela sua alegria, que enche a minha vida de luz...

A minha eterna veterana, Larissa, que primeiramente me abriu as portas, estabelecendo os primeiros contatos. Obrigada por toda a força, apoio, amizade, durante os 4 anos de graduação, depois os 2 anos de mestrado e já me encaminhando para 4 anos de doutorado. Minha eterna madrinha, amiga. Obrigada por tudo, sem você eu não teria chegado até aqui.

A Heloísa, por sua gentileza em me suportar primeiramente, nos meus infundáveis e-mails. Por me abrir as portas, e principalmente por toda a força que me transmitiu durante os 2 anos de mestrado. Mesmo a distância acompanhando todo o trabalho, discutindo, compartilhando, me ajudando dia após dia no meu processo de aprendizagem. E principalmente confiando em mim, sempre. Obrigada pelo carinho e apoio.

Aos colegas de laboratório que me receberam e me auxiliaram no desenvolvimento do trabalho. A Polly, Cecília e Ana por todo carinho, tequilas, tatoos, risadas, com certeza vocês transformaram esses dois anos em algo muito mais significativo.

Em especial, quero agradecer ao trio da Proteômica. Lutamos, rimos, choramos. Sei que um pouquinho da alegria que sinto é partilhada com vocês. Talita pela força, incondicional. Em todos os momentos que pensei em desistir, e você sabe que foram muitos, você sempre me levantava, me animava e me forçava a continuar e a lutar. A Gustavo por toda tranquilidade, quando eu louca, queria acabar com tudo, você me tranquilizava e me colocava nos trilhos novamente. Vocês sabem o quão me é importante ter chegado até aqui e eu não teria conseguido sem os dois. Meu MUITO OBRIGADA.

A banca de acompanhamento e de defesa por terem aceitado participar deste projeto. Às professoras Ana Claudia Bonatto e Roseli Wassem por todo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Enilze por ter aceitado tão prontamente me orientar. Por todo aprendizado que tive durante este período de convivência. Levarei sempre comigo.

Ao Meu Senhor, meu Deus, meu TUDO, sem o qual nada é possível. Contigo Senhor aprendi que o impossível não é o limite. Obrigada por me emprestar diariamente o coração que pulsa, o oxigênio que respiro, o solo em que caminho e milhões de itens para que eu exista!!! Obrigada por suportar nossas brigas e mesmo assim me amar incondicionalmente. Obrigada por nunca me deixar desistir, mesmo que o caminho esteja escuro.

EPÍGRAFE

“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram
aqueles em que lutaste”

Sigmund Freud

RESUMO

O câncer de mama é a malignidade mais comum entre as mulheres em todo o mundo. É definido como um conjunto de doenças complexas causadas por alterações genéticas e epigenéticas que podem resultar em alterações em mecanismos como a proliferação celular, apoptose e angiogênese. Aproximadamente 20% a 30% dos pacientes diagnosticados apresentam doença metastática que é considerada a maior causa de mortalidade associada ao câncer de mama. A proteômica é utilizada como ferramenta na busca de marcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce e no prognóstico do câncer. O objetivo deste trabalho consiste em uma análise comparativa entre o tumor primário e o linfonodo axilar metastático identificando proteínas diferencialmente expressas entre os dois tecidos através das técnicas de eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS). Sete amostras de tumor primário e respectivo linfonodo axilar metastático foram analisados em pacientes com carcinoma ductal. Foram excisados *spots* com valor de $0,001 < p < 0,05$ totalizando 44 identificações positivas, sendo que destas, 33 proteínas distintas. Diferenças quantitativas e qualitativas foram observadas entre os tecidos. As proteínas foram classificadas segundo estudo de Minafra e colaboradores (2006), e banco de dado *UniProtKB/Swiss-Prot* e NCBI como: proteínas de citoesqueleto e associadas (50%), proteínas de crescimento celular e reguladores de proliferação (13%), proteínas com função de ligação/transporte (11%), proteínas de membranas associadas com múltiplas atividades (6%), enzimas metabólicas (4%), enzimas de degradação proteica (2%), proteínas de detoxificação, redox (4%) e chaperonas moleculares (2%) e outras funções (8%). As proteínas diferencialmente expressas identificadas nesta análise proteômica comparativa em tumores primários e linfonodos axilar metastático, em sua maioria estão associadas com progressão tumoral. A grande maioria está diretamente ligada com o citoesqueleto, crescimento e proliferação celular, o que indica que podem atuar de forma ativa nos processos que resultam em metástase. Para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese, é necessária a identificação de marcadores que possibilitem um diagnóstico precoce. Para tal, os dados gerados pela genômica, transcriptômica e proteômica podem contribuir para a descoberta de eventos iniciais da tumorigênese, bem como o esclarecimento dos diversos mecanismos que compõe a progressão tumoral.

Palavras-chaves: Proteômica; Tumor primário; Linfonodo axilar metastático; Gel 2D-PAGE; MALDI-TOF-MS.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy among women all over the world. It is defined as a set of complex diseases caused by genetic and epigenetic changes that can result in alterations of cell proliferation, apoptosis and angiogenesis. Nearly 20%-30% of diagnosed patients present metastatic disease which is considered the greatest cause of mortality associated with breast cancer. Proteomics is used as a tool in the search of markers which can help in early diagnosis and cancer prognosis. The aim of this study consists in a comparative analysis between the primary tumor and the metastatic axillary lymph node identifying differentially expressed proteins between both tissues through the techniques of two-dimensional electrophoresis (2D-SDS-PAGE) and mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Seven samples of primary tumor and its respective metastatic axillary lymph node were analyzed in patients with ductal carcinoma. *Spots* with a p value of $0,001 < p < 0,05$ were excised totaling 44 positive identifications, and of these, 33 distinct proteins and observed quantitative and qualitative differences between tissues. The proteins were classified according to the study of Minafra and colleagues (2006) and *UniProtKB/Swiss-Prot* and NCBI data bank as: cytoskeletal and associated proteins (50%), cell growth proteins and proliferation regulators (13%), proteins with function of binding/transport (11%), membrane proteins associated with multiple activities (6%), metabolic enzymes (4%), enzymes of protein degradation (2%), detoxification and redox proteins (4%), molecular chaperones (2%) and other functions (8%). The differentially expressed proteins identified in this proteomics comparative analysis in primary tumor and metastatic axillary lymph node, were mostly associated with tumor progression. The vast majority is directly linked with cytoskeletal, cell growth and proliferation, which indicated that they can act in an active way in processes that result in metastasis. For a better comprehension of the mechanisms involved in carcinogenesis, it is necessary identifying markers that enable early diagnosis. For that, data generated by genomics, transcriptomics and proteomics can contribute to find early events of tumorigenesis, as well as the elucidation of many mechanisms that comprise tumor progression.

Keywords: Proteomics; primary tumor; Metastatic axillary lymph node; 2D-PAGE gel; MALDI-TOF-MS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos mais incidentes de câncer no Brasil estimados para 2012 por sexo, exceto o de pele do tipo não melanoma*.....	17
FIGURA 2 - Progressão metastática.....	30
FIGURA 3 - Rede linfática distribuída na superfície do tórax, pescoço e abdômen.....	34
FIGURA 4 - Focalização isoeletrica.	38
FIGURA 5 - Esquema de funcionamento do MALDI-ToF-MS.	40
FIGURA 6 - Identificação proteica no MASCOT.....	41
FIGURA 7 - Variação da expressão de <i>heat shock</i> beta-1 (HSPB1). Géis de referência CP 645T (A) e CP 645L (B).	104
FIGURA 8 - Variação da expressão de vimetina (VIME). Géis de referência CP 645T (A) e CP 645L (B).	104
FIGURA 9 - Variação na expressão de proibitina (PHB). Géis de referência CP 645T (A) e CP 645L (B).	105
FIGURA 10 - Gel Bidimensional das amostras de referência CP 641T (A) e CP 645L (B) indicando a localização dos <i>spots</i> identificados. Indicado as variantes de MM e pl.	148
FIGURA 11 - Gel bidimensional das amostras referências CP 641T (A) e CP 645L (B) indicando a localização dos <i>spots</i> identificados ($0,02 < p < 0,05$).	157
FIGURA 12 - Gel Bidimensional das amostras de referência CP 641T(A) e CP 645L (B) indicando a localização dos <i>spots</i> identificados ($p < 0,02$). Indicado as variantes de MM e pl.	160
FIGURA 13 - Espectros gerados na espectrometria de massa na identificação de VIME (3748) e ANXA1 (3974) e suas respectivas massas.	161

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Sistema TNM de classificação de tumores de mama.....	27
QUADRO 2 - Caracterização do grupo amostral	134
QUADRO 3 - Quantificação para as amostras tumorais.	136
QUADRO 4 - Quantificação para as amostras linfonodais	136
QUADRO 5 -- Programa para o <i>Ettan lpgphor li</i> (tira de 13 cm, pH 4-7 Não Linear).....	138

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Proteínas identificadas dados referentes aos critérios de identificação.	144
TABELA 2 - Proteínas identificadas e dados referentes aos critérios de identificação ($0,02 < p < 0,05$).	149
TABELA 3 - Proteínas identificadas apenas em tumor primário.....	152
TABELA 4 - Proteínas identificadas apenas em linfonodo axilar metastático	153
TABELA 5 - Proteínas identificadas com expressão aumentada em tumor	155
TABELA 6 - Proteínas identificadas com expressão aumentada em linfonodo	156
TABELA 7 - Proteínas identificadas e dados referentes aos critérios de identificação ($p < 0,02$).	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D - Bidimensional
2D-SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio
2-DE-DIGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com fluorescência diferencial
AJCC – Comitê da Junta Americana do Câncer
bFGF - Fator de crescimento dos fibroblastos
BSA - Albumina de soro bovino
CHAPS - Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
Da – Dalton
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNMP – Metiltransferase
DTT - Ditioneitol
DCIS – Carcinoma ductal *in situ*
EGFR – Fator de crescimento epidermal
GEF – Fator de troca de nucleotídeo guanina
HIF-1 - Fator de Indução de Hipóxia 1
HER2, ERBB2 ou neu – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal
IARC – Agência Internacional de pesquisa em Câncer
IEF - Focalização isoeletrica
IGH – Imunoglobulina
IHC - Imunohistoquímico
INCA - Instituto Nacional do Câncer
IPG - Gradiente de pH imobilizado
HCCA - Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
LA - Linfonodo axilar
LCIS – Carcinoma lobular *in situ*
LMC - Leucemia Mielóide Crônica
LN - Linfonodo
LOH - Perda de heterozigosidade
LS - Linfonodo sentinela
mA - Miliampère
MALDI – Dessorção por laser ionizante assistida por uma matriz
MALDI-MSI - Imageamento por espectrometria de massa
MEC - Matriz extracelular
M – Molar
mM - milimolar
Mg - Miligrama
mL – Mililitro
MM – Massa molecular
MMP - Metaloproteinases de matriz
MPT - Modificação pós-traducional
mRNA – RNA mensageiro
MS - Espectrometria de massa
MS/MS - Espectrometria de massa em *tandem*
m/z - Razão massa carga
NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
ng - Nanograma
PAGE – Gel de poliacrilamida
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

pI - Ponto isoelétrico
PMA – Microarranjo de proteína
PMF - Impressão digital de peptídeos
ppm - Partes por milhão
RP – receptor de progesterona
RA - Receptor de andrógeno
RNA – Ácido ribonucleico
RE – Receptor de estrogênio
TEM – transição epitelial-mesenquimal
TFA - ácido trifluoracético
TGF- β - Fator de crescimento de transformação β
TMA - Microarranjos de tecido
TME – Transição mesenquimal-epitelial
TNBC – Câncer de mama triplo negativo
TOF – Tempo de voo
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
 μ g - Micrograma
 μ l - Microlitro


SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Etiologia do câncer de mama	19
2.1.1 Mecanismos genéticos.....	19
2.1.2 Mecanismos epigenéticos.....	21
2.2 Classificação do câncer de mama.....	23
2.2.1 Esporádico e Familiar.....	23
2.2.2 Classificação histológica	25
2.2.3 Classificação molecular	27
2.3 Metástase.....	29
2.4 Linfonodos.....	33
2.5 Proteômica	36
2.5.1 Proteômica no câncer de mama	42
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS.....	47
4.1 Gerais	47
4.2 Específicos	47
5. CAPÍTULO I.....	48
ARTIGO	48
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	110
8. REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE	133
MATERIAIS E MÉTODOS	133
Abordagem Ética e Experimental.....	133
Caracterização da amostra.....	133
Coleta do material.....	134
Processamento da amostra.....	135
Análise proteômica	135
Extração e Quantificação das proteínas.....	135
Primeira Separação Proteica	137
Reidratação das tiras de gel (<i>Strips</i>).....	137

Focalização Isoelétrica (IEF)	138
Equilíbrio das tiras	138
Segunda Separação Proteica	139
Preparação do Gel 2D e corrida eletroforética (2D-SDS-PAGE)	139
Fixação	139
Coloração	140
Digitalização e Análise das imagens	140
Identificação das proteínas	141
Concentração proteica com <i>speed vac</i>	142
Purificação Peptídica	142
Identificação e análise dos espectros de massas	143
APÊNDICE 2	144
APÊNDICE 3	149
APÊNDICE 4	152
APÊNDICE 5	155
APÊNDICE 6	158
ANEXO I	162
ANEXO II	163

1. INTRODUÇÃO

O Câncer de Mama é a malignidade mais comum entre as mulheres em todo o mundo, excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma, representando cerca de 23% de todos os tipos de câncer que afetam as mulheres. A cada ano são diagnosticados cerca de 1,38 milhões de novos casos, resultando em mais de 400.000 mortes (ACHARYYA *et al.*, 2012; BOMBONATI e LERWILL 2012). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012) as estimativas para 2012, também válidas para 2013, são de 52.680 novos casos em todo o país, com um risco estimado de 52 casos para cada 100 mil mulheres (Figura 1). Na Região Sul a estimativa é de 65/100.000 novos casos, e para o estado do Paraná e sua capital, Curitiba, são estimados números próximos de 3.110 e 730 respectivamente (INCA, 2012).

Localização primária	casos novos	percentual	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

FIGURA 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos mais incidentes de câncer no Brasil estimados para 2012 por sexo, exceto o de pele do tipo não melanoma*. Fonte: INCA, 2012.

O câncer de mama é definido como um conjunto de diferentes doenças que afetam o mesmo órgão e se originam a partir da mesma estrutura anatômica, mas com características distintas, como as histopatológicas, os fatores de risco, e a resposta a terapias sistêmicas (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

Apesar dos diversos avanços obtidos no diagnóstico e tratamento e, elevação das taxas de sobrevivência, 20% a 30% dos pacientes com diagnóstico de tumor primário de mama apresentarão recorrência da doença em sítios distantes, evidenciando a presença de micrometástases (GALVÃO *et al.*, 2011; VELASCO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2012). A média de sobrevida dos pacientes com doença metastática é de cerca de 1 a 2 anos, e poucos são aqueles que sobrevivem mais

de cinco anos após o diagnóstico de metástase (JONES, 2008 *apud* ACHARYYA *et al.*, 2012). No Brasil, os índices de mortalidade ainda continuam elevados, muito provavelmente devido ao diagnóstico tardio (INCA, 2012).

A melhor maneira de diminuir a mortalidade dos pacientes com câncer é a detecção precoce que resulta em terapias mais efetivas e consequentemente em uma melhor resposta ao tratamento. A mamografia é a melhor abordagem para detecção precoce do câncer de mama em mulheres com idade acima dos 50 anos. No entanto, mesmo com os avanços na resolução de imagens pelas técnicas digitais, esta avaliação não é eficiente para a detecção de tumores menores do que 5 mm, em mulheres mais jovens, devido à densidade do tecido mamário, e também naquelas com câncer de mama lobular (BÖHM *et al.*, 2011; WHELAN *et al.*, 2012). Além disso, até 30% dos tumores detectados por mamografia em mulheres submetidas a exames regulares já apresentam metástases em linfonodos regionais ou à distância no momento do diagnóstico inicial (BÖHM *et al.*, 2011).

Portanto, novas abordagens para o diagnóstico precoce são necessárias a fim de melhorar a detecção e aumentar a taxa de sobrevivência. Abordagens baseadas na identificação de biomarcadores proteicos por espectrometria de massa representa uma nova metodologia para a detecção precoce e consequentemente permite o tratamento no início da doença (WHELAN *et al.*, 2012).

Neste estudo, amostras de tumores primários e respectivos linfonodos axilares metastáticos foram analisadas comparativamente, por técnicas proteômicas, como eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio e espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS). O objetivo principal foi o de identificar as proteínas diferencialmente expressas nestes dois tecidos avaliando o possível envolvimento destas proteínas na tumorigênese mamária, verificando uma possível interação entre elas e os diversos estágios no processo tumoral como angiogênese, linfangiogênese e na consolidação de metástase em linfonodos axilares. Os estudos proteômicos em tecidos cancerosos humanos representam uma importante possibilidade de identificação e consolidação de biomarcadores de relevância no diagnóstico precoce com repercussões terapêuticas e prognósticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia do câncer de mama

O câncer de mama é um conjunto de doenças complexas causadas por alterações genéticas e epigenéticas associadas a fatores não genéticos que resultam em mudanças nos processos celulares, como proliferação celular, apoptose e angiogênese, com subsequente aquisição do fenótipo maligno (GALVÃO *et al.*, 2011). É originado nas células ductais e lobulares da mama e durante o processo de progressão adquire a capacidade de extravasar e infiltrar os tecidos adjacentes à mama, podendo também alcançar tecidos distantes por meio dos sistemas linfáticos e sanguíneos (LEE *et al.*, 2012).

Os eventos genéticos envolvem mutações em genes importantes como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Os eventos epigenéticos incluem metilação de promotores, acetilação das histonas, metilação, fosforilação e remodelação da cromatina (KORKOLA e GRAY, 2010). Além destes fatores, os microRNAs contribuem significativamente para o desenvolvimento da patologia, pois estão associados a processos como proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, apoptose e, além disso, estão envolvidos na cascata de metástase, regulando genes associados a este evento, direta e indiretamente, influenciando os mecanismos epigenéticos (van SCHOONEVELD *et al.*, 2012).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, por isso, são importantes os fatores não genéticos que estão associados ao seu desenvolvimento, como os fatores ambientais, comportamentais e reprodutivos, (nuliparidade, primeira gestação após os 30 anos de idade, menarca precoce, menopausa tardia). A idade continua sendo o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta (BOMBARDIERI *et al.*, 2008; INCA, 2012).

2.1.1 Mecanismos genéticos

Os eventos genéticos associados ao câncer envolvem mutações na sequência do DNA, principalmente em duas classes de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor.

Os proto-oncogenes, em geral são expressos em níveis muito baixos (WEINBERG, 2008), são genes que estão associados ao controle positivo do crescimento celular, e se mutados ocorre um aumento de sua função. Quando isso ocorre são chamados de oncogenes e as proteínas codificadas de oncoproteínas (ALBERTS, 2006). Em situações normais, as células recebem sinais externos, estimulatórios de crescimento que informam as condições do meio circundante a elas. As proteínas codificadas pelos proto-oncogenes participam do recebimento e processamento destes sinais, estimulando a proliferação das células. Quando ocorre uma mutação nesses genes, o fluxo de sinais estimulatórios torna-se desregulado e as células não mais respondem a este controle e passam a expressar constitutivamente proteínas que resultam na proliferação descontrolada das células (WEINBERG, 2008).

A ativação de proto-oncogenes em oncogenes ocorre por mecanismos como amplificação, mutação de ponto e translocação cromossômica.

Na amplificação gênica há um aumento do número de cópias de um gene, devido a uma replicação preferencial de uma região na molécula de DNA. Um importante oncogene que está associado ao câncer de mama e que tem sua expressão elevada por este processo é o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal (*HER2*, *ERBB2* ou *neu*) (WEINBERG, 2008).

O gene *RAS*, outro importante oncogene que está associado a diversos tipos de câncer, inclusive o de mama, é ativado por uma mutação de ponto responsável por uma mudança no quadro de leitura, que resulta em uma proteína truncada e constitutivamente ativa (WEINBERG, 2008).

A translocação resulta na ativação dos proto-oncogenes por dois mecanismos básicos: justaposição e fusão gênica. Na justaposição, o proto-oncogene não mais responde ao seu promotor e torna-se responsivo a um promotor que é bastante ativo, isto é, resulta no aumento significativo do nível de proteína circulante. Ocorre, por exemplo, no Linfoma de Burkitt, onde o gene *MYC*, localizado em 8q24 é justaposto ao promotor dos genes das cadeias pesada (*IGH*, em 14q32) ou leves (*IGK* ou *IGL*, em 2p12 e 22q11, respectivamente) das imunoglobulinas. Já, o exemplo clássico de fusão gênica resultante de uma translocação, ocorre

principalmente na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), quando a proteína híbrida BCR-ABL é formada, resultante da fusão de segmentos dos genes *BCR*, localizado em 22q11, e *ABL* em 9q34 (WEINBERG, 2008).

Os genes supressores de tumor estão associados ao controle negativo do crescimento celular. A indicação da existência destes genes ocorreu a partir dos estudos do retinoblastoma, um raro câncer ocular observado em cerca de uma a cada 20 mil crianças. É diagnosticado desde o nascimento até cerca de 6 a 8 anos de idade e pode ocorrer de forma esporádica ou familiar. No primeiro caso, não há a presença de histórico familiar da doença, a criança apresenta apenas um único tumor em um dos olhos (unilateral), e caso seja curado, não há risco de retinoblastoma nem de outros tipos de câncer em outros órgãos. A forma familiar surge em crianças com histórico familiar no gene *RB* sem, que ocorra, obrigatoriamente, a sua manifestação. Uma segunda mutação no alelo selvagem ou a ocorrência de uma permuta somática pode levar à homozigose. Evidencia-se a presença de múltiplos focos em ambos os olhos (bilateralidade) e um risco aumentado de outros tipos de câncer em idade adulta (WEINBERG, 2008).

Em 1971, Alfred Knudson, baseado em estudos de cinética realizados em tumores esporádicos e familiares da retina, concluiu que a taxa de aparecimento de tumores familiares era consistente com um evento aleatório único, enquanto que na forma esporádica seriam necessários dois eventos aleatórios para a sua formação (WEINBERG, 2008). Esta teoria ficou conhecida como a “Teoria de Knudson” ou a “Teoria dos dois eventos”.

Os eventos que resultam na inativação de um gene supressor de tumor são a mutação pontual, recombinação mitótica, conversão gênica e os eventos epigenéticos.

Para que o aparecimento de um tumor, apenas uma cópia mutada de um proto-oncogene é necessário, indicando dominância, enquanto que em um gene supressor de tumor, ambas as cópias devem estar mutadas, indicando que ambos os alelos são recessivos.

2.1.2 Mecanismos epigenéticos

Admitia-se que os fatores genéticos eram os únicos responsáveis pelo surgimento do câncer, no entanto, atualmente compreende-se com maior consistência a importância da epigenética no desenvolvimento da doença (VEECK e ESTELLER, 2010).

A epigenética é definida como um evento, estável no nível mitótico, no qual há mudanças na expressão de genes sem que haja alterações na sequência do DNA (VEECK e ESTELLER, 2010). Os eventos epigenéticos são somaticamente herdáveis, altamente dinâmicos e estão envolvidos em muitos processos celulares importantes como diferenciação celular, inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, e RNAs de interferência que resultam no silenciamento pós-transcricional (VEECK e ESTELLER, 2010; CHIK *et al.*, 2012).

O epigenoma consiste nas modificações ocasionadas por metilação no DNA, modificações pós-traducionais das caudas das histonas, posicionamento dos nucleossomos, e sob o controle de RNAs não-codificantes (CHIK *et al.*, 2012).

Dois principais mecanismos estão envolvidos na regulação transcricional, a metilação do DNA e as modificações químicas das histonas. A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metil ($-CH_3$) ao carbono 5 de uma citosina no dinucleotídeos CpG. Esta transferência é realizada pela DNA metiltransferase (DNMP) resultando em uma metilcitosina. Os dinucleotídeos CpG estão distribuídos pelo genoma ou localizados nos promotores dos genes podendo se estender até o primeiro éxon, onde são chamados de ilhas CpG (VEECK e ESTELLER, 2010). Por definição, as ilhas CpG são regiões do DNA com mais de 200 pares de bases, contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Muitos tipos de câncer mostram hipometilação global do DNA com raras regiões específicas hipermetiladas quando comparados ao tecido normal correspondente (CHIK *et al.*, 2012). Quando são comparados os tecidos de tumores e normais, observa-se uma diferença nos padrões de metilação. Em tumores observa-se uma hipermetilação regional em genes supressores de tumor, mas uma diminuição da metilação global da 5-metilcitosina, o que resulta na ativação de proto-oncogenes em oncogenes (VEECK e ESTELLER, 2010).

Acreditava-se que mutações causavam rearranjos cromossômicos, o que levaria a uma instabilidade genômica e uma demetilação global, culminando no aparecimento do câncer. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que

mutações aberrantes podem de fato levar a uma modificação no epigenoma e consequentemente ao câncer, mesmo em casos em que não são observados instabilidade genômica. Em tumores de mama foi observado que células em estágio pré-canceroso apresentavam padrões aberrantes de metilação, sugerindo que a perda da metilação pode ser um evento inicial que precede a transformação e não apenas uma consequência da instabilidade genômica (CHIK *et al.*, 2012).

No câncer de mama ocorre a diminuição global de 5-metilcitosina em cerca de 50% dos tumores quando comparados com o tecido normal. A hipometilação, geralmente é identificada em regiões contendo sequências repetitivas e DNA satélite pericentromérico, que em tecidos normais são altamente metilados (VEECK e ESTELLER, 2010).

O segundo evento epigenético importante são as modificações nas caudas N-terminais das histonas, como acetilação, fosforilação, metilação, sumoilização e ubiquitinação, que permitem ou não o acesso à maquinaria de replicação e transcrição.

2.2 Classificação do câncer de mama

2.2.1 Esporádico e Familiar

Duas formas distintas da doença são identificadas: a Hereditária e a esporádica. Na forma hereditária, a história familiar constitui um importante fator de risco, especialmente quando se encontram parentes afetados em três gerações sucessivas, dois ou mais parentes de primeiro grau com diagnóstico da doença no período pré-menopausa, casos de câncer de mama bilateral ou câncer de mama em homens. A ocorrência de pelo menos uma dessas situações, sugere a existência de um componente genético hereditário que predispõe à doença (AMENDOLA e VIEIRA, 2005). A forma hereditária do câncer de mama ocorre em 5 a 10% dos casos (GALVÃO *et al.*, 2011), e em famílias que apresentam múltiplos casos de câncer de mama e ovário, 52% deles é atribuída a mutações no gene *BRCA1* e em 32% ao gene *BRCA2*. A maioria das mutações são deleções de pequenos segmentos cromossômicos e inserções que resultam na expressão de uma proteína truncada (MAVADDAT *et al.*, 2010).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são importantes, pois estão associados diretamente na manutenção da integridade genômica, sendo chamados de “*caretakers*” que são genes que suprimem indiretamente o crescimento neoplásico, codificando proteínas que atuam na manutenção da integridade do genoma, atuando no reparo dos danos nele causados (OLDENBURG *et al.*, 2007). A presença de apenas um dos alelos selvagens é capaz de garantir o controle da proliferação celular (AMENDOLA e VIEIRA, 2005).

O gene *BRCA1* está localizado em 17q21, possui 22 éxons e codifica uma proteína com 1863 aminoácidos, enquanto que o *BRCA2* está localizado em 13q12-13, apresenta 27 éxons e codifica uma proteína com 3418 aminoácidos (OLDENBURG *et al.*, 2007). As proteínas *BRCA1* e *BRCA2* formam grandes complexos umas com as outras e também com outras proteínas no núcleo celular. Não se sabe ao certo como estas proteínas contribuem para a manutenção da estrutura normal do DNA e dos cromossomos impedindo a formação de tumores. Acredita-se que seja devido ao fato de se ligarem a tantas proteínas nucleares distintas, muitas das quais envolvidas no reparo do DNA, sugerindo a formação de grandes estruturas moleculares que associadas colaborem no reparo de lesões (WEINBERG, 2008).

Outros genes de susceptibilidade ao câncer de mama estão bem identificados como o *PTEN* e o *TP53*, que assim como os *BRCA1/2* são genes de alta susceptibilidade. Além destes, outros conferem de moderado a baixo risco como o *ATM*, *CHEK2*, *CASP8*, *PBR1* e *BRIP1* (BRADBURY e OLOPADE, 2007).

O gene supressor de tumor *TP53* é um dos mais importantes no controle celular e está localizado em 17p13. Sua presença determina o bom funcionamento das células, e na presença de alguma desordem metabólica ou dano genético, ele impede o avanço do ciclo celular e coordena respostas localizadas para reparar o dano. Se isto não acontecer ele ativa sinais de apoptose, com consequente morte celular. A inativação do *TP53* confere vantagem às células cancerosas, pois permite que mutações sejam acumuladas em uma taxa mais alta do que o normal, sem que haja a ativação de genes apoptóticos. Esta elevada mutabilidade aumenta a taxa na qual os oncogenes se tornam ativos e os genes supressores de tumor inativos (WEINBERG, 2008).

Na forma esporádica, que ocorre em 90-95% dos casos (GALVÃO *et al.*, 2011), a doença é resultante de mutação somática principalmente em genes

supressores de tumor, como o *TP53*, e proto-oncogenes, como o *HER2*. Perda de heterozigose (LOH), metilação, amplificação e perda de regiões cromossômicas estão também envolvidas na carcinogênese mamária (KORKOLA e GRAY, 2010). Nos esporádicos, alterações em ambos os genes *BRCA1/2* são pouco frequentes (AMENDOLA e VIEIRA, 2005).

2.2.2 Classificação histológica

Os tumores mamários envolvem todas as malignidades do tecido mamário, e são classificados histologicamente com base no tamanho do tumor, grau histológico, presença/ausência de linfonodos metastáticos, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP).

Histologicamente são classificados em tumores “*in situ*” e invasivos. Os carcinomas “*in situ*” são caracterizados pelas células do tumor localizadas dentro dos ductos (carcinoma ductal “*in situ*” - DCIS) e lóbulos (carcinoma lobular “*in situ*” - LCIS), sem invasão na matriz extracelular. Os carcinomas invasivos correspondem a mais de dez diferentes tipos de tumores, sendo que destes, 65-80% representam os tumores do tipo ductal, 5-15% os tumores do tipo lobular, e 0,1-4% são dos tipos mucinosos, medular, tubular, e carcinomas apócrinos (HONDERMARCK *et al.*, 2001). Os tumores epiteliais malignos são caracterizados pela invasão do tecido adjacente e tendência a metástase em locais distantes do tumor primário (BOMBARDIERI *et al.*, 2008).

Atualmente, três parâmetros são avaliados na caracterização dos tumores não invasivos e invasivos: formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e taxa mitótica. Um sistema de escore de I a III é utilizado para que cada parâmetro seja individualmente avaliado. Os tumores são classificados quanto ao grau em bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) e pouco diferenciado (grau III) (BOMBARDIERI *et al.*, 2008).

O TNM é o sistema mais usado para a classificação de tumores malignos e a descrição de sua extensão anatômica (INCA, 2012). Este sistema tem por base a avaliação de três componentes: T - extensão do tumor primário, N – ausência/presença e extensão de metástase em linfonodos regionais e M – ausência/presença de metástase à distância do tumor primário. A estes são

acrescentados números que indicam a extensão da doença (Quadro 1) (BOMBARDIERI *et al.*, 2008).

Classificação	Definição
T	Tumor primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão (T1mic, T1a, T1b e T1c)
T2	Tamanho do tumor entre 2 e 5 cm
T3	Tumor com mais de 5 cm
T4	Tumor de mais de 5 cm com extensão à parede torácica ou à pele (T4a, T4b, T4c, T4d)
N	Linfonodo Regional
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), móvel(eis)
N2	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(ais) fixo(s) ou clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(ais), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es). (N2a e N2b)
N3	Metástase em linfonodo(s) intraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s). (N3a, N3b, N3c)
M	Metástase a distância
MX	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

QUADRO 1 - Sistema TNM de classificação de tumores de mama.
FONTE: O autor, 2013.

O estadiamento do câncer da mama é de importância prognóstica, fornecendo informações para a terapia adequada, para cada estágio do desenvolvimento da doença (BOMBARDIERI *et al.*, 2008).

2.2.3 Classificação molecular

O câncer de mama é uma doença heterogênea e classificada em subtipos, com características moleculares, clínicas e patológicas distintas (POLYAK e VOGHT, 2012).

Desde os primeiros estudos de *Perou* e colaboradores (2000), com cDNA *microarrays*, têm-se tentado classificar molecularmente os tumores mamários. Atualmente são subdivididos em luminal A e luminal B, superexpressão do HER2 ou ERBB2, *basal-like*, *normal-like*, claudina baixa e apócrino molecular (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011; PEDDI *et al.*, 2012).

Os tumores luminais são oriundos das células luminais epiteliais e possuem alta expressão de mRNA e proteínas deste tecido bem como genes do RE e associados. São os mais heterogêneos em termos de expressão gênica (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). São divididos em luminal A e luminal B. O subtipo luminal A apresenta níveis elevados de expressão do RE e do RP e está associado a bom prognóstico. O subtipo luminal B apresenta níveis baixos de expressão do RE e do RP e HER2 negativo ou positivo além dos genes associados a eles. Possui alta taxa de proliferação das células tumorais, e baixa resposta terapêutica quando comparado ao subtipo luminal A (PEDDI *et al.*, 2012).

O subtipo HER2 possui alta expressão de *HER2*, *GRB7*, e de genes adjacentes ao *locus* do *HER2*. Este subtipo está associado a um pior prognóstico. Alguns tumores apresentam superexpressão do oncogene *HER2*, mas não são classificados como subtipo HER2 devido à coexpressão de RE (PODO *et al.*, 2010; PEDDI *et al.*, 2012).

Por estudos de expressão de mRNA observou-se uma diferença nos tumores classificados clinicamente como HER2, indicando a existência de dois grupos de HER2 positivo, um clinicamente classificado com HER2 positivo e outro

no qual foi observado a expressão de mRNA e proteínas HER2. Quando comparados, observou-se a presença do fator de crescimento epidermal (EGFR) e HER2. No entanto, apenas, 50% dos tumores clinicamente HER2 pertencem a este grupo mRNA HER2, a outra metade foi observada predominantemente nos subtipos de mRNA luminais (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

Ainda comparando estes dois grupos, no intuito de se identificar diferenças entre eles, observaram-se a existência de 302 genes e 36 proteínas diferencialmente expressos. Os tumores mRNA HER2 mostraram expressão significativamente mais elevada de *FGFR4*, *EGFR*, *HER2*, bem como de genes dentro do fragmento amplificado do HER2, os tumores clinicamente classificados como HER2, mas que estão inseridos nos luminais apresentaram uma elevada expressão de genes luminais *GATA3*, *BCL2* e *ESR1* (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

O *basal-like* é um subtipo no qual há expressão de citoqueratinas basais/mioepiteliais como as CK5/6, CK17, caderina, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) e genes associados com proliferação celular. Estas informações são utilizadas para identificação deste subtipo, embora outros marcadores tenham um valor de prognóstico bem maior (PODO *et al.*, 2010; PEDDI *et al.*, 2012; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Em alguns casos, são imunohistoquimicamente negativos para a expressão de RE, RP e HER2, o que pode ser confundido com o subtipo triplo-negativo (TNBC), que são tumores definidos pela negatividade dos RE, RP e HER2 e estão presentes em cerca de 10-17% dos carcinomas mamários (PODO *et al.*, 2010).

Embora haja sobreposição entre os dois, cada um apresenta características distintas. Segundo Peddi e colaboradores (2012), cerca de 70% dos tumores TNBC foram classificados em determinadas situações como *basal-like* e 76% destes como TNBC. Morfologicamente, os tumores *basal-like* são de alto grau histológico, apresentam necrose e alta contagem mitótica (PODO *et al.*, 2010). De fato, nem todos os tumores *basal-like* são negativos para RE, PR e HER2, e nem todos os triplos negativos apresentam fenótipo *basal-like*, embora a vasta maioria o seja (REIS-FILHO, 2008).

A tripla negatividade utilizada para identificar os tumores *basal-like* imunohistoquimicamente é altamente sensível, no entanto, não é tão específica quanto a utilizada para os tumores luminais e HER2 (PODO *et al.*, 2010). Isto porque

os marcadores para cada um desses tipos são específicos para cada subgrupo, enquanto que para o *basal-like* pode resultar em um diagnóstico errôneo, interpretado como TNBC.

O subtipo *normal-like* apresenta características semelhantes aos tecidos normais, apresentando alta expressão de genes de células adiposas e outros tipos de células não epiteliais, além de baixos níveis de marcadores luminais (VALENTIN *et al.*, 2012).

O subgrupo que apresenta baixa expressão de claudina, *claudin-low*, está classificado como um grupo dentro dos TNBC, e é caracterizado pela baixa expressão de genes associados à junção *tight* responsável pela adesão célula-célula. Entre estes genes estão as claudinas 3, 4 e 7, ocludina e a E-caderina. Neste subgrupo há um aumento da expressão de genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (TEM) (VALENTIN *et al.*, 2012).

O subgrupo apócrino molecular é caracterizado pelo aumento da expressão do receptor de andrógeno (RA). Imunohistoquimicamente, estes tumores são RE e RP negativos e RA positivo, embora quase todos os tumores RE positivos expressem RA (VALENTIN *et al.*, 2012).

2.3 Metástase

Metástase é um processo complexo formado por múltiplas etapas no qual há um crescimento descontrolado de células tumorais em locais distantes do sítio do tumor primário (BANFALVI, 2012; NOLA *et al.*, 2012). Alterações nas funções vitais dos órgãos afetados resultam em 90% de mortalidade associada ao câncer (NOLA *et al.*, 2012). A migração das células tumorais pode ocorrer através do sangue ou linfonodos, no câncer de mama ocorre preferencialmente por meio do sistema linfático, e a extensão de comprometimento é um fator de grande importância no prognóstico e tratamento (LEE *et al.*, 2012).

Alguns tumores têm uma alta probabilidade de disseminação, enquanto que outros raramente o fazem. As células tumorais podem ter afinidade por microambientes de alguns órgãos específicos. Os cânceres de mama em geral se disseminam para cérebro, pulmão, fígado e ossos. Em alguns casos, no diagnóstico,

o paciente já possui células metastáticas que ainda não são passíveis de visualização (WEINBERG, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

A progressão de metástase ocorre quando as células tumorais adquirem a capacidade de invadir o tecido adjacente, intravasas os vasos sanguíneos e linfáticos, circular pelo corpo, extravasar, formar micrometástases e por fim as macrometástases que colonizam o novo sítio (CARMONA, 2012). O crescimento, invasão e metástase de um tumor são dependentes do acesso deste aos suplementos sanguíneos, e isto ocorre por diversos fatores incluindo a angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos. Normalmente, este evento está restrito ao desenvolvimento e reprodução dos tecidos e em casos de regeneração tecidual, no entanto, em tumores malignos, a angiogênese é desencadeada pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e células inflamatórias. Os novos vasos são estruturalmente e funcionalmente anormais (Figura 2) (HILL *et al.*, 2011).

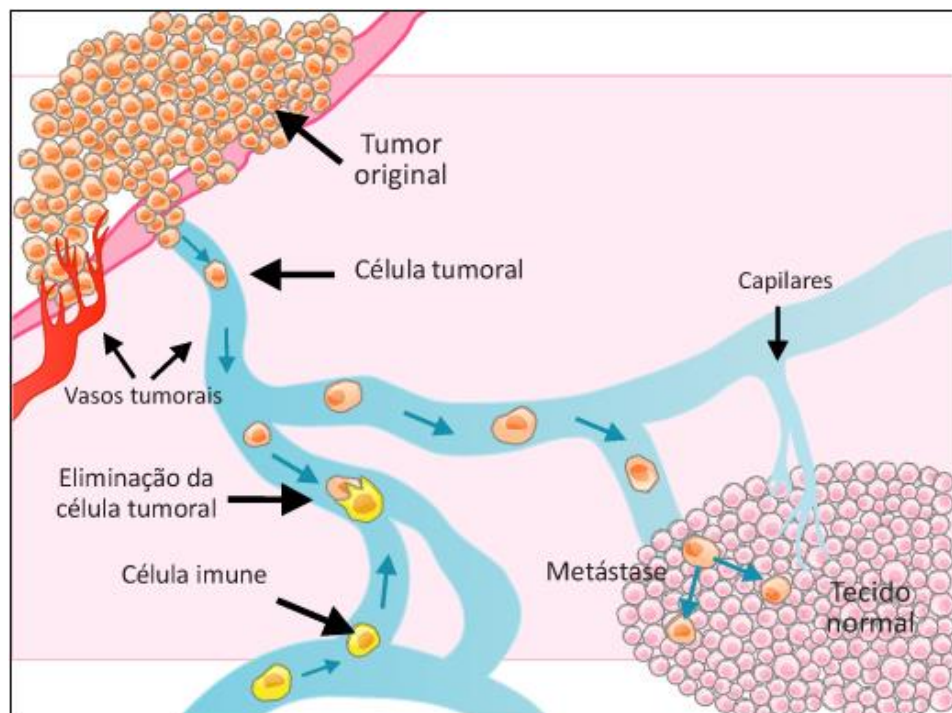


FIGURA 2 - Progressão metastática.
Fonte: INCA, 2012.

Em tecidos epiteliais, as células epiteliais estão situadas sobre o estroma. Entre estas, situa-se a matriz extracelular (MEC), que é composta por proteínas que são expressas pelas células epiteliais e estromais. Nas células tumorais são encontradas além das células epiteliais algumas células estromais como

fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células musculares lisas e adipócitos. A presença destes tipos celulares é importante no processo de invasão, já que o crescimento do tumor é acompanhado do crescimento das células estromais. Além disso, as células tumorais podem ser auxiliadas por células da medula óssea na promoção da angiogênese e também no estabelecimento dos nichos pré-metastáticos nos órgãos distantes (WEINBERG, 2008; KANG *et al.*, 2012).

A linfangiogênese, que consiste no crescimento de novos vasos, normalmente rara em adultos, ocorre em processos patológicos como sítios inflamatórios induzidos por fatores produzidos por macrófagos e granulócitos, cicatrização de feridas e câncer (ALITALO e DETMAR, 2012; MARTÍNEZ-CORRAL *et al.*, 2012). Quando ocorre uma lesão, as plaquetas se agrupam e liberam grânulos contendo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação β (TGF- β). O PDGF estimula a proliferação de fibroblastos e o TGF- β atua sobre estes fibroblastos ativando-os. Uma vez ativados eles induzem a liberação das metaloproteinases de matriz (MMPs) que irão degradar a matriz extracelular. O plasma sanguíneo fornece o fibrogênio que é metabolizado em fibrina, resultando na base do coágulo sanguíneo (WEINBERG, 2008).

A degradação da matriz extracelular libera fatores, que estão inativos quando associados a ela, mas que neste momento são ativos. Dentre eles estão os fatores de crescimento dos fibroblastos (bFGF), TGF- β 1, PDGF. Com os fatores liberados pelas plaquetas, células como monócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos que auxiliam na liberação do fator de crescimento endotelial (VEGF) que está associado com o processo de angiogênese são atraídos. O TGF- β 1 atua sobre os fibroblastos convertendo-os em miofibroblastos que estão envolvidos na contração da lesão (WEINBERG, 2008).

As células epiteliais também são transformadas. Para reconstruir o local lesionado, elas têm sua adesão a MEC diminuída, resultando no aumento da mobilidade. As adesões célula-célula também são perdidas e há uma baixa expressão de E-caderina e aumento da expressão de N-caderina. Essa substituição confere às células epiteliais um fenótipo de células mesenquimais, constituindo a TEM. Nesta fase as células são móveis e invasivas. Após a migração e reconstituição do tecido lesado, as células retornam a seu fenótipo epitelial, aumentando a expressão de E-caderina e diminuindo a expressão de N-caderina.

Este processo é chamado de transição mesenquimal-epitelial (TME) (WEINBERG, 2008).

A estimulação e crescimento de vasos pré-existentes pelo tumor facilita a disseminação tumoral via vasos linfáticos, além de contribuir para a linfangiogênese intratumoral, além disso, os fatores de crescimento produzidos pelo tumor produz uma hiperplasia que pode contribuir para o processo metastático (MARTÍNEZ-CORRAL *et al.*, 2012).

Após a invasão do tecido adjacente, as células tumorais necessitam sobreviver dentro dos vasos linfáticos e sanguíneos. As plaquetas têm sido reconhecidas como um componente muito importante de proteção para as células metastáticas circulantes. No entanto, ainda não se sabe como a pressão arterial dentro dos capilares pode influenciar as características metastáticas das células sobreviventes (SETHI e KANG, 2011). O processo de invasão dos capilares é denominado intravasão e o processo inverso, ou seja, a saída dos capilares de extravasão (WEINBERG, 2008).

Durante a disseminação, as células metastáticas podem se tornar dormentes, cessando a proliferação por um tempo indefinido. Neste estado, são resistentes à ação dos quimioterápicos dirigidos às células em constante proliferação (ALITALO e DETMAR, 2012).

Diversos estudos têm mostrado que o intervalo entre a aquisição da capacidade invasiva e o estabelecimento da metástase é muito curto, principalmente quando comparado com o intervalo entre a progressão de um tumor benigno até o desenvolvimento de um câncer (SETHI e KANG, 2011).

Atualmente, a metástase não é mais considerada um fluxo unidirecional entre os tumores primários e órgãos distantes. Um novo conceito tem sido proposto sobre a interação do tumor com o estroma e o sítio distante de metástase, na tentativa de elucidar as bases da colonização. Os modelos de nicho pré-metastático e metástases *self-seeding* admitem a interação entre o estroma e o sítio secundário. De acordo com este modelo, células-tronco hematopoiéticas são previamente requeridas por fatores de crescimento do tumor para determinados locais no organismo criando um ambiente menos hostil às células tumorais disseminadas. De acordo com o *self-seeding* as células disseminadas podem retornar ao local do tumor primário e auxiliar no crescimento e evolução. As citocinas

inflamatórias têm sido consideradas como participantes do nicho pré-metastático e do *self-seeding* (SETHI e KANG, 2011).

2.4 Linfonodos

O sistema linfático é uma via circulatória na qual grandes proteínas, partículas, células, que não podem ser recolhidos pelo sangue, são coletados dos tecidos (GUYTON e HALL, 2006). Em adição, os vasos linfáticos também transportam células do sistema imune e células cancerosas (ALITALO e DETMAR, 2012). Os linfonodos (LN), também denominados gânglios linfáticos, são os maiores componentes do sistema linfático, e estão reunidos em pequenos grupos responsáveis pela drenagem nos ductos linfáticos. Esta drenagem não consiste apenas na filtração, mas também no reconhecimento e processamento de antígenos (IOACHIM e MEDEIROS, 2009).

Metástases de carcinomas mamários ocorrem em linfonodos regionais responsáveis pela filtração da linfa da mama. Dois grupos anatômicos de linfonodos estão envolvidos em metástases: os linfonodos axilares (LA) e internos, sendo os axilares os primeiros a serem afetados por células metastáticas (IOACHIM e MEDEIROS, 2009).

De acordo com *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* os LAs estão divididos anatomicamente em três níveis cirúrgicos, tendo como referência o músculo peitoral menor: nível I que corresponde aos linfonodos axilares peitorais (anteriores), subescapulares (posteriores) e umerais (laterais); nível II se refere aos centrais, interpeitorais (Rotter) e alguns apicais; o nível III, linfonodos axilares apicais (Figura 3.) (MILIOLI, 2011).

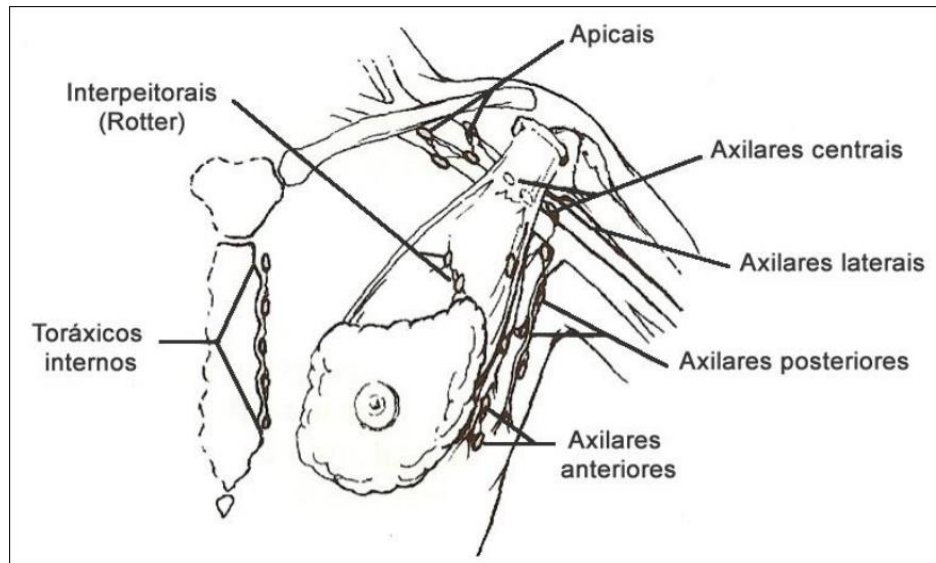


FIGURA 3 - Rede linfática distribuída na superfície do tórax, pescoço e abdômen.
FONTE: MILIOLI, 2011

Metástases em sítios secundários são consideradas como a maior causa de morbidade e mortalidade associada ao câncer de mama (LI *et al.*, 2008). Portanto, o sistema linfático é muito importante para o diagnóstico de doença metastática, pois são os linfonodos os primeiros a desenvolverem metástase, e por isso, o seu comprometimento é de importância na decisão da terapia que deverá ser aplicada ao paciente (LI *et al.*, 2008; CARMONA *et al.*, 2012). Assim, a presença de células metastáticas nos linfonodos é um indicativo de que outras regiões também possam conter células tumorais disseminadas (CARMONA *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que indivíduos com LN negativo tem um melhor prognóstico do que aqueles com LN positivo. No entanto, um terço dos pacientes diagnosticados como LN negativo podem vir a desenvolver metástases em locais secundários enquanto que um terço dos LN positivos podem nunca desenvolver doença metastática (LI *et al.*, 2008).

A determinação das condições do LN é avaliada pela identificação e excisão do linfonodo sentinela (LS) realizada no momento da cirurgia de remoção do tumor primário. Em seguida é realizada a análise histológica que pode incluir ou não imunohistoquímica (CAWTHORN *et al.*, 2012) e tem uma acurácia de 93,5-97,5% (VALENTE *et al.*, 2012). O conceito de linfonodo sentinela foi primeiramente apresentado por Virchow em meados do século XIX, no entanto Braithwaite foi o primeiro a usar o termo “glândula sentinela”, em 1923 (cf. TIEZZI *et al.*, 2006).

No câncer de mama, a biópsia do linfonodo sentinela, o primeiro linfonodo da cadeia linfática, demonstrou ser um procedimento de estadiamento eficiente e evita a linfadenectomia em pacientes com resultados negativos (MADSEN *et al.*, 2012). O LS por ser o primeiro linfonodo da cadeia linfática é também o primeiro a receber os fluidos da linfa e conseqüentemente as células cancerosas oriundas do tumor primário, decorrente da passagem ordenada das células pelo sistema linfático. A técnica de identificação do LS ocorre pela injeção de um corante azul no tumor ou pelo uso de radiofármacos que percorrem os ductos linfáticos (VALENTE *et al.*, 2012; WEINBERG, 2008). Esta técnica permite que baixos falso-positivos sejam diagnosticados.

Até a introdução da análise do linfonodo sentinela, todos os pacientes com câncer de mama invasivo eram submetidos ao esvaziamento total dos linfonodos axilares (CAVALLI, 2011). Entre as conseqüências deste procedimento estavam o aparecimento de infecções locais, redução da mobilidade do braço, dor local de moderada a intensa, diminuição da qualidade de vida do paciente, seroma e linfedema (TIEZZI *et al.*, 2006). Na prática, o exame histopatológico dos LAs removidos demonstraram que uma parte significativa dos pacientes não apresentava células metastáticas, principalmente em pacientes em estágio inicial da doença, o que reduziu as complicações decorrentes do procedimento invasivo por primeiro referido (MILIOLI, 2011).

O risco de metástase em linfonodos é diretamente proporcional ao tamanho do tumor. O número de linfonodos axilares comprometidos bem como a localização também tem alto valor preditivo nas taxas de sobrevida. Observou-se que em pacientes LN negativos a taxa de sobrevida, após 5 anos, foi de 83%, com um linfonodo comprometido de 80%, diminuindo para 65-70% com dois a três, para 54% quatro a seis e 28% de sobrevida com mais de 12 linfonodos comprometidos (IOACHIM e MEDEIROS, 2009).

Atualmente não existe nenhuma técnica não invasiva tão precisa quanto a do linfonodo sentinela para estadiamento axilar. Vários métodos não cirúrgicos também têm sido utilizados, com sucesso variável, para prever o comprometimento de linfonodos, dentre eles exame físico, mamografia digital, ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (VALENTE *et al.*, 2012).

2.5 Proteômica

Proteômica é o estudo do 'proteoma' ou da expressão das proteínas na célula em um nível global (APTE e MEHENDALE, 2005). O proteoma corresponde ao conjunto de proteínas encontradas em um tipo celular no tecido no qual está inserida esta célula (BRUSIC *et al.*, 2007). A proteômica envolve a quantificação e identificação das proteínas expressas pelo genoma do organismo em resposta ao seu desenvolvimento normal, envelhecimento, doenças e alterações no ambiente circundante (SOMIARI *et al.*, 2005). A caracterização de uma proteína inclui a análise da sequência de aminoácidos que a compõe, modificações pós-traducionais (MPT), *splicing* alternativo, identificação de possíveis ligantes e localização celular (GUO *et al.*, 2007).

O proteoma sofre modificações ao longo do tempo, por responder a fatores autócrinos, endócrinos e parácrinos, mediados pela corrente sanguínea, temperatura, terapias e doenças. Portanto, a análise dos níveis de expressão das proteínas é necessária para elucidar as mudanças críticas que ocorrem e que podem resultar na patogênese de uma doença, já que são elas as efetoras dos processos celulares (GUO *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2012). Os níveis e funções das proteínas dependem da tradução e também das modificações pós-traducionais, que influenciam na atividade e estabilidade das mesmas (GONZALEZ-ANGULO *et al.*, 2011).

Com o desenvolvimento da genômica acompanhada do sequenciamento do genoma humano, a proteômica objetiva elucidar questões referentes aos processos fisiológicos normais e patológicos. Nos últimos dez anos, a proteômica tem contribuído em vários aspectos nos estudos clínicos, incluindo a compreensão da patogênese de doenças, descoberta de novos biomarcadores para o diagnóstico precoce, bem como a identificação de novas drogas e vacinas (RAY *et al.*, 2011).

Biomarcadores podem ser alterações em genes como deleções e amplificações, polimorfismos, ou alterações nas biomoléculas que são utilizadas para auxiliar no monitoramento da progressão da doença e prognóstico em resposta às intervenções terapêuticas. A identificação de biomarcadores de proteínas é útil na detecção precoce de doenças como o câncer (RAY *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2012) e

indicação do estado biológico de células, tecidos e fluidos corpóreos pode ser utilizada na classificação e detecção de uma doença (BRUSIC *et al.*, 2007).

As técnicas proteômicas podem ser mais ou menos diferenciadas de acordo com a necessidade ou não de um conhecimento prévio do material biológico (BERTUCCI *et al.*, 2006). Em análises sem o uso do espectrômetro de massa, é necessário que se tenha um conhecimento prévio das proteínas a serem analisadas, utilizando-se anticorpos específicos para aquelas proteínas. Em geral são utilizadas técnicas baseadas em microarranjos de tecido (TMA) e de proteína (PMA), estes utilizados mais recentemente; método ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*); Imunohistoquímico (IHC) e *Western Blot*. Nas técnicas que utilizam espectrômetro de massa não é necessário conhecimento prévio das proteínas contidas no material biológico a ser analisado (GALVÃO *et al.*, 2011).

Os métodos que podem definir e medir um grande número de proteínas desconhecidas são baseados em espectrometria de massa (MS), requerendo, no entanto, uma preparação “a priori” da amostra (BASKIN e YIĞITBAŞI, 2010). O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons gasosos, separando-os segundo sua relação massa/carga (m/z), utilizando um campo magnético. É composto por uma fonte ionizante, um analisador de massa e um detector (GALVÃO *et al.*, 2011; QIN e LING, 2012).

O primeiro procedimento para a preparação da amostra consiste na separação das proteínas. De todos os métodos de separação, a Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) é a mais amplamente utilizada. Há duas formas de PAGE, eletroforese em gel de uma dimensão (1D-PAGE) e eletroforese em gel de duas dimensões (2D-PAGE) (SOMIARI *et al.*, 2005).

No gel 1D-PAGE a separação ocorre na presença de um campo elétrico e se dá pela massa molecular. As proteínas separadas podem ser visualizadas no gel por coloração com azul de Coomassie ou nitrato de prata. Em geral é produzida uma única banda, onde estão contidas várias proteínas. Esta banda é excisada para identificação no espectrômetro de massa. Em amostras que contêm proteínas muito complexas, como em tumores, esta técnica é muito eficiente, por apresentar uma boa resolução e separação (SOMIARI *et al.*, 2005).

Atualmente existem dois métodos baseados em gel de poliacrilamida. O gel de duas dimensões (2-DE-PAGE) e o em gel de duas dimensões de fluorescência diferencial (2-DE-DIGE). O primeiro consiste na separação de misturas complexas

de proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (PI), através da focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, e de acordo com sua massa molecular por 2D-SDS-PAGE na segunda dimensão. A direção do movimento da proteína na segunda dimensão é perpendicular ao da primeira, e o resultado deste processo é a visualização das proteínas na forma de “spots” que potencialmente representam uma proteína presente na amostra. No segundo tipo, uma mistura de dois ou três extratos com várias moléculas fluorescentes é realizada e separada em um gel. O gel bidimensional 2D é capaz de separar centenas de proteínas, e informações como o ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MM) e quantidade de cada proteína, podem ser obtidas. Em geral, a análise é realizada comparativamente, a fim de se verificar os níveis de proteínas em tecidos diferentes submetidos a condições distintas, no entanto a dificuldade consiste em repetibilidade e uniformização da técnica. (DWEK e PEIRIS, 2012; QIN e LING, 2012).

As proteínas são moléculas anfóteras, e podem possuir cargas elétricas positivas, negativas ou não possuírem nenhuma carga líquida de acordo com o pH. A carga líquida de uma proteína corresponde à soma de todas as cargas negativas e positivas de suas cadeias de aminoácidos terminais amino e carboxílico. O ponto isoelétrico, portanto, corresponde ao pH específico no qual a carga líquida de uma determinada proteína é igual a zero, ou seja, é eletricamente neutra. As proteínas são carregadas positivamente em valores de pH abaixo do seu pI e negativamente em valores de pH acima do pI. Na focalização isoelétrica a proteína irá se mover em um gradiente de pH sob a influência de um campo elétrico até que atinja o seu pI (Figura 4) (GE HEALTHCARE, 2011).

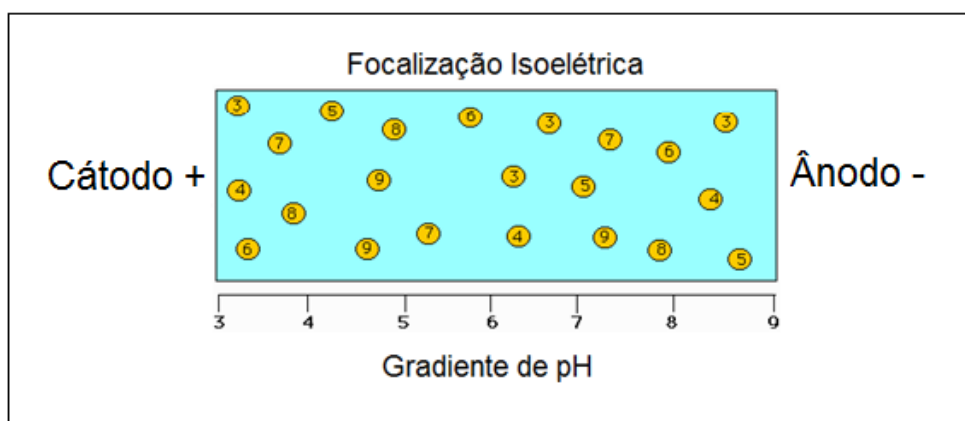


FIGURA 4 - Focalização isoelétrica.
FONTE: O autor, 2013.

Após a focalização e eletroforese, as bandas são excisadas, digeridas, e os fragmentos de peptídeos resultantes são analisados por MS.

Os procedimentos que podem ser utilizados para identificação dos peptídeos são impressão digital de peptídeos (PMF); espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). No PMF a relação massa carga (m/z) em geral é obtida por dessorpção por laser ionizante assistida por uma matriz (MALDI) combinada com o tempo de voo (ToF) (GUO *et al.*, 2007).

As proteínas identificadas pelo método de impressão digital de peptídeos são obtidas a partir do espectrômetro do tipo MALDI-ToF que utiliza o MALDI como fonte acoplada a um analisador de massas que analisa o tempo de voo dos peptídeos obtidos pela digestão enzimática. Essa análise é determinada pela razão massa/carga de cada peptídeo (SILVEIRA, 2009).

No MALDI-ToF-MS os fragmentos de proteínas ou peptídeos são cristalizados em uma matriz sólida, bombardeados por um feixe de laser que quando incide sobre a matriz a torna excitada pela absorção de feixes provenientes do laser, transferindo prótons para os peptídeos que se tornam ionizados positivamente. Esta energia resultante da ação do laser causa dessorpção da mistura (matriz e peptídeo) que passa para o estado gasoso. Ao passar por um campo elétrico, o peptídeo carregado positivamente é repelido pelas cargas de mesma natureza e é impulsionado pelo tudo de voo sob vácuo e sem campo elétrico, que utiliza a diferença do tempo de voo das substâncias ionizadas de acordo com a sua massa e tamanho, sendo que as de menor massa são primeiramente detectadas (CUNHA *et al.*, 2006) (Figura 5) (DAVIS e HANASH, 2006).

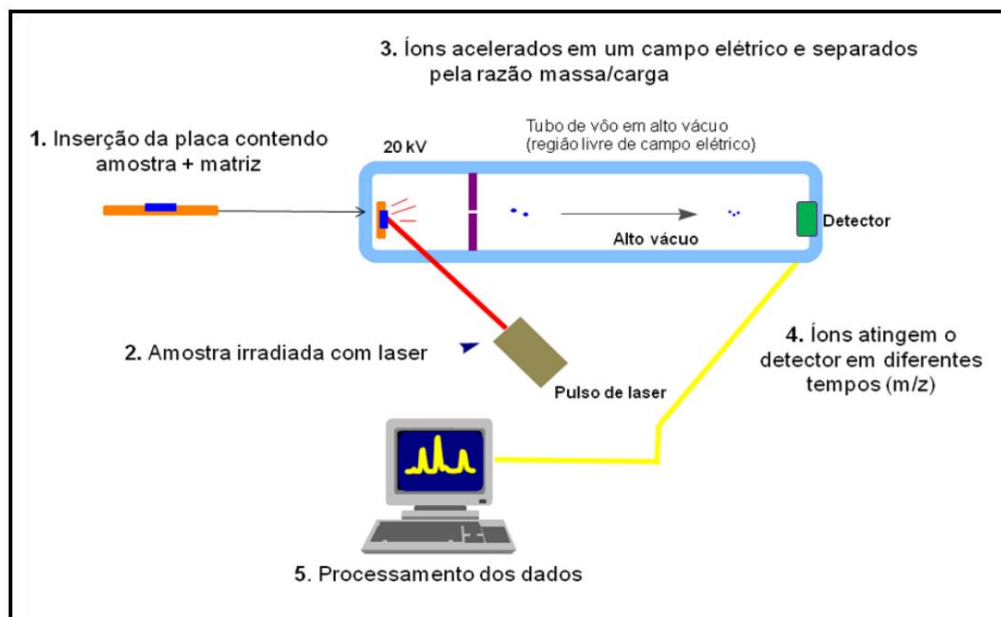


FIGURA 5 - Esquema de funcionamento do MALDI-ToF-MS.
 FONTE: COSTA, 2010.

A identificação de uma proteína é baseada na massa dos seus peptídeos obtidos na clivagem, o qual é chamado *fingerprinting* ou “impressão digital” de uma proteína. A identidade da proteína é obtida pela comparação das massas obtidas dos peptídeos com bancos de dados como o MASCOT (disponível em <http://www.matrixscience.com>) e no UniprotKB (disponível em http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html) (Figura 6) (WINDEN *et al.*, 2012).

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name **Email**

Search title

Database(s) SwissProt NCBI nr contaminants cRAP

Enzyme Trypsin

Allow up to 1 missed cleavages

Taxonomy All entries

Fixed modifications Carbamidomethyl (C)

Display all modifications ☐

Variable modifications Oxidation (M)

Protein mass kDa **Peptide tol. \pm** ppm

Mass values ☒ MH⁺ ☐ M_r ☐ M-H⁻ **Monoisotopic** ☒ **Average** ☐

Data file Escolher arquivo Nenhum arquivo selecionado

Query
 NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.

Decoy ☐ **Report top** AUTO hits

Start Search ... **Reset Form**

FIGURA 6 - Identificação proteica no MASCOT.
 Fonte: COSTA, 2010.

O aperfeiçoamento das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa permitiram grandes avanços na proteômica. Uma tecnologia importante que também contribuiu de maneira significativa foi a bioinformática, com o desenvolvimento de programas computacionais capazes de analisar, armazenar e correlacionar grande quantidade de dados, além de disponibilizar informações através da internet (BISCH, 2004; QIN e LING, 2012).

A proteômica é dependente da bioinformática, que possibilita a conversão dos dados proteômicos bruto em aplicações úteis, e da estatística para manejo e interpretação de grande quantidade de dados resultantes do alto rendimento da triagem e análise de proteínas (BRUSIC *et al.*, 2007).

Como já referido, atualmente, a proteômica tem sido amplamente utilizada como um método importante na detecção de marcadores associados ao câncer de mama que auxiliem no diagnóstico precoce da doença e no prognóstico, já que, durante o processo tumoral as células interagem e alteram seu microambiente, secretando uma variedade de proteínas incluindo fatores de crescimento, proteinases responsáveis pela degradação da matriz extracelular, fatores que auxiliam na motilidade das células tumorais, migração celular, metástase e angiogênese, citocinas e moléculas que estão associadas a interações célula-célula e célula-substrato (RAY *et al.*, 2011; WARMOES *et al.*, 2012). Além disso, os estudos proteômicos podem auxiliar no monitoramento do tumor em resposta à administração de drogas e desenvolvimento de novos fármacos, bem como o entendimento dos mecanismos que resultam no desenvolvimento da doença (TAN *et al.*, 2012).

A expressão de mRNAs nos tumores é diferencial quando comparado à quantidade de proteínas expressas, que é muito superior, o que justifica a importância de se estudar estes efetores. Além disso, os dados fornecidos pelos mRNAs não são capazes de prever as modificações como fosforilação, glicosilação, acetilação, dentre outros, nem prever os possíveis locais onde são encontradas dentro e fora das células, além das interações proteína-proteína e das redes de sinalização. Somado a isso, as funções proteicas são reguladas por um sistema complexo de comunicação intra e extracelular com outras células e o microambiente (TAN *et al.*, 2012).

Pacientes com câncer de mama podem responder diferencialmente ao mesmo tratamento, assim, a identificação de proteínas individualmente expressas pode auxiliar no desenvolvimento de uma terapia individualizada (TAN *et al.*, 2012). Portanto, os estudos proteômicos podem modificar o procedimento terapêutico e auxiliar na construção de um painel de biomarcadores relacionados ao diagnóstico precoce da doença.

2.5.1 Proteômica no câncer de mama

Diversos estudos, em proteômica vêm sendo realizados com o objetivo de se entender a epidemiologia, curso clínico e biologia do câncer de mama.

A proteômica é capaz de quantificar as proteínas e assim comparar diretamente dois conjuntos de tecidos fisiologicamente distintos (CAWTHORN *et al.*, 2012).

Os estudos de perfis de proteínas baseados em espectrometria de massa realizadas em amostra de carcinomas mamários podem identificar possíveis marcadores que auxiliem no diagnóstico e manejo da doença (QIN e LING, 2012). Além disso, a proteômica funcional objetiva a geração de informações sobre as proteínas encontradas, bem como o nível de expressão proteica, gerando informações relevantes sobre a biologia, química e genética dos tumores que são necessárias para o entendimento da ação de drogas (KOLCH e PITT, 2010).

Alguns estudos proteômicos têm validado resultados encontrados nos estudos genômicos. Palacios e colaboradores (2008), utilizando 37 proteínas como biomarcadores, confirmou a relação entre os cânceres com mutação no gene BRCA2 e as ciclinas do tipo D (D1, D3) e CDK4; nos cânceres com mutação no gene BRCA1 houve relação com ER e HER2. Nos subtipos lobulares e ductais, proteínas como EMP1, DVL1, DDR1, PRKC1 e E-caderina foram identificadas como biomarcadores (QIN e LING, 2012).

QIN e LING (2012) analisando tumores dos tipos luminal A e luminal B, HER2, basal e normal-*like*, e comparando com características patológicas, identificaram 97 biomarcadores proteicos, dentre eles ER, PR, HER-2, p53, CK5/6, CK8/18, ciclina E, Ki-67, BCL2, ciclina D1 and E-caderina.

A proteômica funcional analisa também a formação de interações proteicas, verificando as vias de sinalização das células cancerosas. As complexas interações proteína-proteína são importantes na maioria dos processos celulares, desde as transduções de sinal, na maquinaria de transcrição, transporte intracelular e motilidade celular (KOLCH e PITT, 2010).

A via de sinalização do EGFR é uma das vias mais estudadas e relevantes no câncer, por coordenar diversas respostas dentro da célula. A proteômica, por sua vez, tem decifrado os componentes dos complexos proteicos e também contribuído para o entendimento das vias de sinalização *downstream* a ele. Análise proteica baseada em MS de proteínas que interagem com fosfopeptídeos que são fosforilados em resposta à ligação ao ligante revelaram que quatro membros da família ErbB tem preferência diferencial por seus parceiros de ligação. O mapa resultante destas interações nesta família mostrou que a ligação do complemento

difere entre os dímeros de receptores, com o dímero ERBB2 (HER2) com o ERBB3 tendo uma maior interação, seguido de EGFR (ERBB1) com ERBB3, EGFR-ERBB2, EGFR-EGFR. Os dímeros do ERBB estão associados com maior poder transformante, e quanto mais frequente forem estes dímeros, maior a oncogenicidade (KOLCH e PITT, 2010).

Os estudos proteômicos são também de interesse para a análise da expressão diferencial de proteínas no tumor primário e no tumor metastático, e das mudanças que resultam no remodelamento da matriz extracelular. Em ambas as situações objetivam-se identificar marcadores que possam fornecer um diagnóstico precoce e tratamento mais eficientes a pacientes com alto risco de metástase (SUN *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2012).

O uso de métodos como o Imageamento por espectrometria de massa (MALDI-MSI), que consiste na combinação de análises da massa molecular e informação espacial, fornece uma visualização ou imagem bidimensional das moléculas em superfícies complexas, permitindo a localização e identificação da proteína no tecido. Tem sido usado em estudo moleculares do câncer, fornecendo marcadores de diagnóstico específicos de um tumor dentro de um contexto morfológico (ABDELNUR, 2008; KANG *et al.*, 2012).

KANG e colaboradores (2012) demonstraram que a histologia do tumor e a sobrevivência do paciente se correlacionam com os padrões de expressão de proteínas obtidos a partir de análise de MALDI-MSI do cérebro, mama, ovário, cólon e tumores da próstata.

Em mitocôndrias, a estratégica proteômica visa a identificação de biomarcadores associados à tumorigênese e metástase. Acredita-se que alterações nestas organelas possam estar associadas com a agressividade do tumor, angiogênese, invasão. Nos trabalhos de Wadhwa e colaboradores (CHEN *et al.*, 2011) a alta distribuição subcelular de mortalina, tem mostrado associação com a agressividade em uma variedade de linhagens celulares de tumores humanos, e o aumento no nível de expressão desta proteína no citoplasma é capaz de ativar a via de sinalização Ras-Raf inativando a ação da proteína p53, resultando em uma alta proliferação celular. Esta proteína, baseada nas similaridades, é classificada como outro membro da família das chaperonas *heat shock* (CHEN *et al.*, 2011; LONDONO *et al.*, 2012).

Outra proteína envolvida na tumorigênese associada às mitocôndrias é o Fator de Indução de Hipóxia 1 (HIF-1), que é responsável pela ativação de vários genes entre eles alguns envolvidos na angiogênese, transição epitelial-mesenquimal, metástase, e metaloproteinases de matriz (CHEN *et al.*, 2011).

Chen e colaboradores (2011) através do uso de linhagem celulares de câncer de mama invasivas e não invasivas, encontraram proteínas mitocondriais diferencialmente expressas entre as linhagens normais e transformadas, embora apenas 26% sejam de fato mitocondriais. Entretanto, algumas proteínas mitocondriais são capazes de se deslocarem para o citosol, onde exercem suas funções, reduzindo a porcentagem de proteínas consideradas mitocondriais (CHEN *et al.*, 2011).

Nagaraja e colaboradores (2006) utilizando gel 2-DE com coloração com prata, identificaram 26 proteínas diferencialmente expressas entre células de mama transformadas com diferentes níveis de invasividade e células normais. No entanto apenas duas proteínas, subunidade VIb do citocromo c oxidase e superóxido dismutase, são mitocondriais (CHEN *et al.*, 2011).

As proteínas diferenciais identificadas pelas pesquisas proteômicas estão proporcionando uma exploração biológica sistemática dos mecanismos moleculares subjacentes à fisiopatologia de tumores atribuíveis à metástase linfática, e indicando novos potenciais alvos terapêuticos para esses casos.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea, e de acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC) é o tipo de mais frequente entre as mulheres e o segundo tipo de neoplasia maligna mais frequentemente relacionada à mortalidade em todo o mundo. A etiologia e diversidade clínica do câncer de mama estão relacionadas a um processo de múltiplas etapas, caracterizado por alterações genéticas e epigenéticas que direcionam a progressão de uma célula normal para tumoral. O conhecimento mais efetivo dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese depende da determinação e intensificação de pesquisas com metodologias mais informativas, com maior poder de resolução. A identificação de proteínas específicas para o câncer pode fornecer biomarcadores de diagnóstico e prognóstico mais preciso e novos alvos terapêuticos moleculares além de contribuir para a detecção precoce de metástases e para o monitoramento da progressão do câncer.

Em um prévio trabalho do nosso grupo de pesquisa que culminou na Dissertação de Mestrado de Heloisa Helena Zaccaron Milioli, foram analisadas proteínas de tumores primários e dos respectivos linfonodos axilares metastáticos de oito pacientes com limite de significância estatística de $p < 0,02$. Complementando este estudo, foram analisadas proteínas diferencialmente expressas em amostras de sete pacientes, sendo que dentre essas apenas uma amostra não fez parte do trabalho anterior, com *spots* diferencialmente expressas com limite de significância de $0,02 < p < 0,05$. Além disto, algumas proteínas do trabalho anterior ($p < 0,02$), cuja identificação havia sido duvidosa, foram reanalisadas para confirmação ou ajuste da identificação.

4. OBJETIVOS

4.1 Gerais

Analisar comparativamente as proteínas expressas em amostras de tumores primários de mama e respectivo linfonodo axilar metastático e avaliar as variações que possam ser relevantes como marcadores na detecção precoce do processo metastático, terapêuticos e prognósticos no câncer de mama contribuindo para o entendimento das vias biológicas responsáveis pela transformação e progressão neoplásica.

4.2 Específicos

- ❖ Identificar proteínas diferencialmente expressas em amostras de carcinoma primário de mama e respectivo linfonodo axilar metastático, com limite de significância de 0,02 a 0,05;
- ❖ Identificar e confirmar algumas proteínas identificadas anteriormente com nível de significância abaixo de 0,02.
- ❖ Avaliar o possível envolvimento de produtos proteicos na origem e evolução de células tumorais, linfangiogênese e metástase em linfonodos axilares;
- ❖ Identificar possíveis biomarcadores que possam contribuir na prática clínica para o diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer metastático;
- ❖ Analisar, a correlação dos achados proteicos com o desenvolvimento e progressão de células tumorais;

5. CAPÍTULO I

ARTIGO

Análise proteômica em carcinomas ductais esporádicos primários de mama e em metástases de linfonodos axilares correspondentes.

Autores

Karla Santos Sousa¹, Heloísa Helena Zaccaron Milioli², Gustavo Góes da Costa¹, Talita Helen Bombardelli Gomig¹, Rubens S. de Lima³, Cicero Urban³, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹.

¹Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

²University of Newcastle, NSW, Austrália

³Unidade da Mama. Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná.

Resumo

O câncer de mama é a malignidade mais comum entre as mulheres em todo o mundo. Aproximadamente 20 a 30% das pacientes diagnosticadas apresentam doença metastática que é considerada a maior causa de mortalidade associada ao câncer. Para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo metastático, é necessária a identificação de marcadores que possibilitem um diagnóstico precoce da migração das células cancerosas. A análise proteômica pode contribuir como eficiente ferramenta na busca de proteínas com expressão diferencial que possam auxiliar como marcadores neste processo. O objetivo principal deste trabalho foi a análise proteômica comparativa entre o tumor primário e o linfonodo axilar metastático correspondente. Sete amostras pareadas foram analisadas em pacientes com carcinoma ductal. O método utilizado foi a eletroforese bidimensional (2D-PAGE-SDS) seguida da espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS). Sete amostras de tumor primário e respectivo linfonodo axilar metastático foram analisados em pacientes com carcinoma ductal. Foram excisados s Diferenças quantitativas e qualitativas foram observadas entre os tecidos. *Spots* com valor de significância de $0,02 < p < 0,05$ foram analisados, totalizando 21 proteínas distintas. As proteínas foram classificadas segundo estudo de Minafra e colaboradores (2006), e com a utilização do banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* e NCBI como: proteínas de

citoesqueleto e associadas (38%), proteínas de crescimento celular e reguladores de proliferação (14%), proteínas com função de ligação/transporte (14%), proteínas de membranas associadas com múltiplas atividades (14%), enzimas metabólicas (5%), enzimas de degradação proteica (5%), proteínas de detoxificação e redox (5%) e chaperonas moleculares (5%). As proteínas diferencialmente expressas identificadas nesta análise proteômica comparativa em tumores primários e linfonodos axilar metastático, em sua maioria estão associadas com progressão tumoral. A grande maioria está diretamente relacionada ao citoesqueleto, crescimento e proliferação celular, o que indica que podem atuar de forma ativa nos processos que resultam em metástase.

Palavras-chaves: Proteômica; Tumor primário; Linfonodo axilar metastático; Gel 2D-PAGE; MALDI-TOF-MS.

Introdução

O câncer de mama é um conjunto complexo e heterogêneo de doenças resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Estas alterações, como as mutações, rearranjos, variações no número de cópias, metilação do promotor e modificação de histonas, culminam em mudanças nos processos celulares, como proliferação celular, apoptose e angiogênese, com subsequente aquisição do fenótipo maligno (HOLM *et al.*, 2010; GALVÃO *et al.*, 2011).

Apesar dos avanços obtidos no diagnóstico e tratamento com consequente elevação das taxas de sobrevivência, 20% a 30% dos pacientes com diagnóstico de tumor primário de mama apresentarão recorrência da doença devido à presença de micrometástases (GALVÃO *et al.*, 2011; VELASCO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2012).

Além de proteínas como os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2), utilizadas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama, novas proteínas são avaliadas como possíveis biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos. No entanto, a heterogeneidade intratumoral de expressão da proteína, dificulta a identificação de proteínas que tenham relevância clínica para o câncer de mama (MALINOWSKY *et al.*, 2013).

A proteômica, portanto, tem sido utilizada como um método importante na detecção de marcadores associados ao câncer de mama que auxiliem no diagnóstico precoce da doença e no prognóstico, já que, durante o processo tumoral as células interagem e alteram seu microambiente, secretando uma variedade de

proteínas incluindo fatores de crescimento, proteinases responsáveis pela degradação da matriz extracelular, fatores que auxiliam na motilidade das células tumorais, migração celular, metástase e angiogênese, citocinas e moléculas associadas a interações célula-célula e célula-substrato (RAY *et al.*, 2011; WARMOES *et al.*, 2012). Além disso, os estudos proteômicos podem auxiliar no monitoramento do tumor em resposta à administração de drogas e desenvolvimento de novos fármacos, bem como o entendimento dos mecanismos que resultam no desenvolvimento da doença (TAN *et al.*, 2012).

O objetivo principal deste trabalho foi a identificação de proteínas expressas diferencialmente entre tumores primários de mama e linfonodos axilares metastáticos correspondentes, visando identificar novos marcadores de progressão tumoral.

Materiais e métodos

Caracterização da amostra

As amostras de tumores e respectivos linfonodos axilares metastáticos foram obtidas a partir de sete pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor submetidas a procedimento cirúrgico nos anos de 2011 e 2012. As amostras foram coletadas no ato cirúrgico e acondicionadas em tubos estéreis para transporte ao laboratório. O estudo foi aprovado pelo Comitê local de Ética e todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A média de idade das pacientes foi $62,14 \pm 7,62$ anos. Histologicamente, os tumores foram avaliados de acordo com a diferenciação celular, formação do túbulo/glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas. Destes, 28,6% foram classificados como bem diferenciados (grau I), 57,1% moderadamente diferenciados (grau II) e 14,3% como pouco diferenciados (grau III). Quanto à presença do receptor de estrogênio e progesterona, 71,4% das pacientes eram positivas, enquanto que 28,6% apresentaram negatividade para os dois receptores.

Extração e quantificação

A lise das células foi realizada em tubos *ependorf* de 1,5mL contendo 1000µL de Tampão de lise (7M de ureia, 2M de tioureia, 40mM de tris e 4% de CHAPS) e 2µL de inibidor de protease adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). A lise mecânica ocorreu com o auxílio de homogeneizador elétrico. Após, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm (5 minutos a 4°C). O precipitado foi descartado e o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C. A quantificação foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Eletroforese 2D

A reidratação das tiras IPG de 13cm, (pH 4-7, GE Healthcare), em tampão de reidratação (7M de ureia, 2M de tioureia e 2% de CHAPS) e amostra em um volume final de 250µl e 1000µg de proteínas, foi realizada durante 18 horas e 30 minutos. A focalização isoeletrica ocorreu no sistema *EttanIPGphor II* (GE Healthcare) por cinco horas. A segunda dimensão ocorreu um gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) realizada em cuba de eletroforese Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare). Ao final o gel foi fixado e corado com Coomassie coloidal e lavado com água destilada.

Digitalização e análise de imagens

Os géis foram digitalizados no *ImageScannertm II* (GE Healthcare) e a análise das imagens realizadas pelo software *ImageMastertm2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os parâmetros utilizados no programa para identificação dos *spots* foram: *min area* – 5; *smooth* – 3; e *saliency* – 25. Os géis originados de tumores e linfonodos foram comparados quantitativamente (quanto à variação na expressão) e qualitativamente (quanto à presença e ausência de proteína). Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *t* de Student, considerando como *spots* diferencialmente expressos os que apresentaram variação estatística significativa

entre 0,02 e 0,05 ($0,02 < p < 0,05$). Os *spots* com $p < 0,02$ já haviam sido analisados em outro momento.

Identificação proteica

Os *spots* relevantes foram excisados manualmente, descorados, desidratados e digeridos com tripsina (100µg de tripsina - *Sequencing Grade Modified Trypsin* - Promega - em 100µL de solução de ácido acético 50mM) juntamente com tampão de enzima (para a preparação de 1mL – 40µL de AMBIC 40mM; 100µL de acetonitrila 100% e 860µL de água *Mili-Q*).

Os peptídeos resultantes foram submetidos à concentração 5% com TFA (ácido trifluoracético 5% e acetonitrila 50%) e submetidos a uma centrifugação em *speed vac* por 30 minutos. Por fim, os peptídeos foram ressuspensos com TFA 0,1%.

Antes de serem aplicados na placa do MALDI, os peptídeos concentrados foram submetidos a outro processo de concentração utilizando uma ponteira com uma coluna de fase reversa (*PerfectPure C-18 Tip* - Eppendorf).

Os peptídeos foram misturados à matriz de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico) na proporção 1:1. Do volume final de 2µl, 1µl foi aplicado na placa para MALDI (*scout MTP MALDI ion source 384 target*– Bruker Daltonics).

Os picos de massas dos peptídeos foram determinados utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo *Autoflex II* (Bruker Daltonics) com base na dessorção/ionização das proteínas com laser auxiliado por uma matriz, que analisa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise. O programa de identificação utilizado foi o *FlexControl 2.0* (Bruker Daltonics) e a análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o *FlexAnalysis 2.0* (Bruker Daltonics).

O padrão de massa obtido por PMF foi comparado com as informações existente nos bancos de dados do MASCOT onde foi possível a identificação das proteínas. Os nomes e siglas utilizados para as proteínas foram obtidos no banco de dados *UniprotKB*.

Resultados e discussão

Foram identificadas 21 proteínas distintas em 31 *spots* com identificação positiva dentro da faixa de significância de $0,02 < p < 0,05$. A tabela 1 apresenta todas as proteínas identificadas neste trabalho.

A figura 1 corresponde aos géis de referência CP 641T e CP 645L com a localização dos *spots* e respectivas proteínas com identificação positiva no tumor primário e no linfonodo axilar metastático.

As tabelas 2 e 3 apresentam todos os *spots* identificados com expressão exclusiva no tumor ou no linfonodo, respectivamente. As tabelas 4 e 5 apresentam os *spots* identificados com expressão diferencial em tumor e linfonodo, respectivamente.

Os parâmetros utilizados na identificação no MASCOT incluíram *score*, percentual de cobertura de sequência e número de peptídeos sobrepostos. Baseado no trabalho de Dupont e colaboradores (2005), as diferenças entre os valores teóricos e observados de massa molecular e ponto isoelétrico foram avaliados conforme os parâmetros $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$. Este parâmetro informa com uma maior confiabilidade que as proteínas e seus respectivos *spots* estão localizados no gel na posição esperada. Dentre os *spots* identificados 54,84% dos *spots* se encontravam no local esperado.

TABELA 1 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (0,02<p<0,05)

Proteína (SIGLA)	ID	Código <i>UniprotKB</i> ^a	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	ΔMM% / ΔPi	Cobertura de sequência%	Nº/ peptídeos sobrepostos
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS								
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	1	P60709	145 / 40	42.052 / 5.29	45.000/ 5.2521	7,0 / 0,04	30	09 / 11
Actina citoplasmática 2 (ACTG)		P63261		42.108 / 5.31		6,9 / 0,06	30	09 / 11
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	2	P60709	107/56	42.052/ 5.29	56.000/ 5.4609	26,0 / 0,17	25	08 / 12
Actina citoplasmática 2 (ACTG)		P63261		42.108 / 5.31		26,0 / 0,17	25	08 / 12
Proteína <i>heat shock</i> beta-1 (HSPB1)	3	P04792	105/27	22.826 / 5.98	28.000/ 5.5163	22,7 / 0,46	28	07 / 13
	4		98 / 36		27.000/ 6.3040	18,3 / 0,32	37	06 / 10
	5		124 / 28		29.000/ 6.7162	27,0 / 0,74	46	08 / 22
	6		115/33		29.000/ 5.9700	27,0 / 0,01	40	08 / 22
Queratina do citoesqueleto 19 - tipo 1 (K1C19)	7	P08727	79 / 31	44.079/5.04	42.000/ 4.8127	4,7 / 0,23	13	06 / 08
	8		140/40		43.000/ 4.7410	2,4 / 0,3	25	11 / 17
Queratina do citoesqueleto - tipo 2 (K2C7)	9	P08729	102/27	51.411/5.40	50.000/4.7140	2,7 / 0,69	25	11 / 24
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	10	P52565	101 / 35	23.250 / 5.02	28.000/ 5.0111	20,4 / 0,01	29	06 / 08
Proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP)	11	P13693	65/34	19.697/4.84	26.000/4.7470	32,0 / 0,09	18	04 / 06
	15	P08670	93 / 33		50.000/ 4.7878	6,8 / 0,27	24	90/ 20

Anexina A1 (ANXA1)	32	P04083	105/22	38.918/6.57	38.000/6.8088	2,4 / 0,24	30	09 / 18
Proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5)	33	Q15124	57/40	62.756/6.81	59.000/5.5219	6,0 / 1,29	11	05 / 09
Prelamina-A/C (LMNA)	34	P02545	68/34	74.380/6.57	61.000/6.8987	18,0 / 0,33	11	06 / 08
ENZIMAS METABÓLICAS								
Aminoacilase-1 (ACY1)	35	Q03154	160/45	46.084/5.77	43.000/ 6,1587	6,7 / 0,39	20	10/10
DEGRADAÇÃO PROTÉICA								
Subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5)	37	P28066	78 / 37	26.565 / 4.74	28.000 / 4.6834	5,4 / 0,06	24	04/ 04
DETOXIFICAÇÃO E PROTEÍNAS REDOX								
Glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1)	38	P78417	72/35	27.833/6.23	31.000/5.9283	11,4 / 0,3	19	04/ 04
CHAPERONAS MOLECULARES								
Endoplasmina (ENPL)	40	P14625	78/41	92.696/4.76	64.000/4.6972	31,0 / 0,06	7	07 / 08

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no UniprotKB; ^b, ^c valor obtido no MASCOT; ^dValores obtidos de $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$ (Dupont *et al.*, 2005); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico

TABELA 2– SPOTS IDENTIFICADOS APENASEM TUMOR PRIMÁRIO

<i>Spot</i> - ID	Código <i>UniprotKB</i> ^a	Proteína (SIGLA)	VD-CP	<i>p</i> <	<i>Locus</i> Gênico	MM (kDa) / <i>pl</i> observados	Δ MM% / Δ <i>pl</i>	<i>Score</i> ^b	Cobertura %
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS									
CP 645T – 1	P60709	Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	1000000		7p22	45.000 / 5.25	7,0 / 0,04	145 / 40	30
	P63261				17q25		6,9 / 0,06		
CP 641T – 2	P60709	Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	1000000		7p22	56.000 / 5.46	26,0 / 0,17	107/56	25
	P63261				17q25		26,0 / 0,17		
CP 641T – 3	P04792	Proteína <i>heat shock</i> beta-1 (HSPB1)	1000000		7q11.23	28.000 / 5.51	22,7 / 0,46	105/27	28
CP 644T – 7						42.000 / 4.81	4,7 / 0,23	79 / 31	13
CP 644T – 8	P08727	Queratina do citoesqueleto 19 - tipo 1 (K1C19)	1000000		17q21.2	43.000 / 4.74	2,4 / 0,3	140/40	25
CP 645T - 10	P52565	Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	1000000		17q25.3	28.000 / 5.0111	20,4 / 0,01	101 / 35	29
CP 630T – 15						50.000 / 4.78	6,8 / 0,27	93 / 33	24
	P08670	Vimentina (VIME)	1000000		10p13				

CP 641T – 16					40.000 / 4.68	25,5 / 0,38	158/33	24
CP 641T – 17					41.0000 / 4.68	23,6 / 0,37	182/36	30
CP 641T - 19					46.000 / 4.91	14,3 / 0,14	142/40	21
CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR								
CP 622T - 25	P35232	Proibitina (PHB)	1000000	17q12-q21	27.000 / 6.74	9,5 / 1,17	218/40	52
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO/TRANSPORTE								
CP 641T - 31	P02774	Ligante de Vitamina D (VTDB)	1000000	4q12-q13	57.0000 / 5.31	4,5 / 0,09	93 / 37	20
PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MEMBRANA COM MÚLTIPLAS ATIVIDADES								
CP 644T - 33	Q15124	Proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5)	1000000	9q21.11	59.000 / 5.52	6,0 / 1,29	57/40	11
CP 630T - 34	P02545	Prelamina-A/C (LMNA)	1000000	1q22	61.000 / 6.89	18,0 / 0,33	68/34	11
DEGRADAÇÃO PROTEICA								

CP 645T - 37	P28066	Subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5)	1000000	1p13	28.000 / 4.68	5,4 / 0,06	78 / 37	24
DETOXIFICAÇÃO E PROTEÍNAS REDOX								
CP 644T - 38	P78417	Glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1)	1000000	10q25.1	31.000 / 5.92	11,4 / 0,3	72 / 35	19

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no UniprotKB; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o spot está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pI conforme o banco de dados ExPASy; ^b valor obtido no MASCOT

TABELA 3 – SPOTS IDENTIFICADOS APENAS EM LINFONODO AXILAR METASTÁTICO

Spot- ID	Código <i>UniprotKB</i> ^a	Proteína (SIGLA)	VD-CP	<i>p</i> <	Locus Gênico	MM (kDa) /pl observados	ΔMM% / Δpl	Score ^b	Cobertura %
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS									
CP 667L–4	P04792	Proteína <i>heat shock</i> beta-1 (HSPB1)	1000000		7q11.23	27.000 / 6.30	18,3 / 0,32	98 / 36	37
CP 667L–6						29.000 / 5.97		115 / 33	40
CP 667L–9	P08729	Queratina do citoesqueleto - tipo 2 (K2C7)	1000000		12q13.13	50.000 / 4.71	2,7 / 0,69	102 / 27	25

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no *UniprotKB*; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o spot está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pl – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pl conforme o banco de dados ExPASy; ^b valor obtido no MASCOT

TABELA 4– SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA no TUMOR

Spot- ID	Código UniprotKB ^a	Proteína (SIGLA)	VD- CP	p<	Locus Gênico	MM (kDa) /pI observados	ΔMM% / ΔpI	Score ^b	Cobertura %
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS									
CP 645T - 5	P04792	Proteína <i>heat shock</i> beta-1 (HSPB1)	4,285	0,05	7q11.23	29.000 / 6.71	27,0 / 0,74	124 / 28	46
CP 645T - 11	P13693	Proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP)	2,125	0,02	13q14.13	26.000 / 4.74	32,0 / 0,09	65 / 34	18
CP 644T - 18	P08670	Vimentina (VIME)	3,437	0,05	10p13	30.000/ 5.23	44,1 / 0,17	152/29	37
CRESCIMENTO CELULAR E REGULADORES DE PROLIFERAÇÃO									
CP 644T - 21	P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta (1433Z)	6,127	0,05	8q22	31.000 / 4.59	11,1 / 0,13	109 / 33	28
CP 644T - 24	P35232	Proibitina (PHB)	4,542	0,02	17q12-q21	30.000 / 5.59	0,5 / 0,03	266 / 64	54
PROTEÍNAS COM FUNÇÕES DE LIGAÇÃO/TRANSPORTE									
CP 644T - 27	P54920	Proteína de ligação solúvel NSF alfa (SNAA)	4,807	0,02	19q13.33	36.000 / 5.23	6,9 / 0,01	112 / 28	28

CP 630T - 30	P02768	Albumina sérica (ALBU)	2,561	0,02	4q11-q13	59.000 / 5.79	17,3 / 0,12	62 / 29	10
PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MEMBRANA COM MÚLTIPLAS ATIVIDADES									
CP 630T - 32	P04083	Anexina A1 (ANXA1)	4,765	0,05	9q12-q21.20	38.000 / 6.80	2,4 / 0,24	105 / 22	30
ENZIMAS METABÓLICAS									
CP 641T - 35	Q03154	Aminoacilase-1 (ACY1)	4,837	0,02	3p21.1	43,000 / 6,15	6,7 / 0,39	160/45	20

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no *UniprotKB*; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o *spot* está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pI conforme o banco de dados Expasy; ^b valor obtido no MASCOT

TABELA 5– SPOTS COM EXPRESSÃO AUMENTADA EM LINFONODO

<i>Spot</i> - ID	Código <i>UniprotKB</i> ^a	Proteína (SIGLA)	VD- CP	<i>p</i> <	Locus Gênico	MM (kDa) /pI observados*	ΔMM% / ΔpI	Score ^b	Cobertura %
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS									
CP 622L - 20	P08670	Vimentina (VIME)	2,398	0,05	10p13	55.000/5.26	2,5 / 0,21	92/43	22
CRESCIMENTO CELULAR E REGULADORES DE PROLIFERAÇÃO									
CP 641L - 22	Q9NRI5	Proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1)	2,362	0,05	1q42.1	77.000/6.73	18,8 / 0,77	66/30	7
CHAPERONAS MOLECULARES									
CP 644L - 40	P14625	Endoplasmina (ENPL)	4,314	0,05	12q24.2-q24.3	64.000 / 4.69	31,0 / 0,06	78/41	7

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no *UniprotKB*; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o *spot* está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pI conforme o banco de dados Expasy; ^b valor obtido no MASCOT

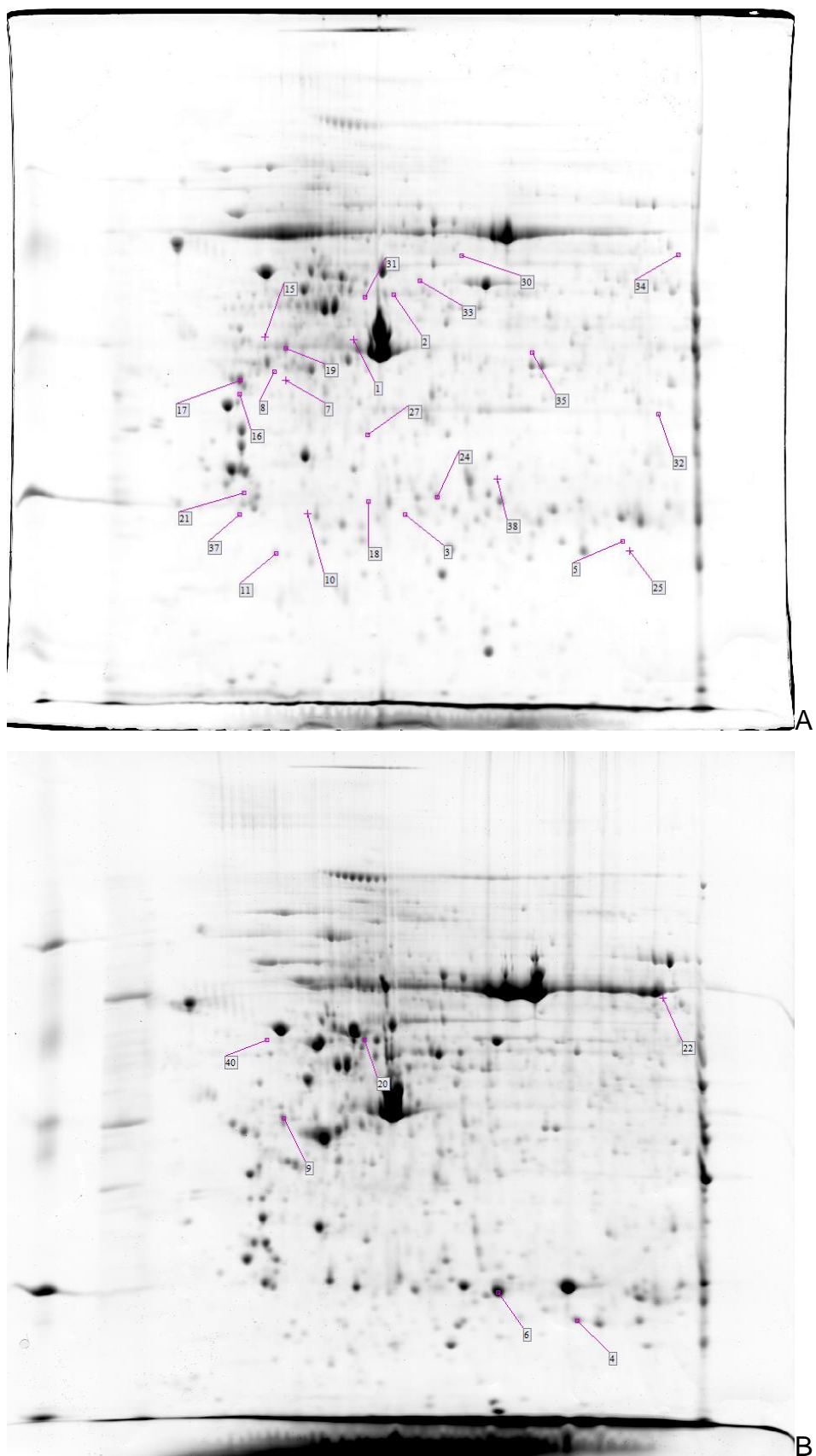


FIGURA 1 - Gel bidimensional das amostras referências CP 641T (A) e CP 645L (B) indicando a localização dos *spots* identificados.
FONTE: O autor (2013).

Utilizando como critério o trabalho de Minafra e colaboradores (2006) juntamente com as informações obtidas na literatura e nos bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *UniProtKB/Swiss-Prot*, as proteínas identificadas foram classificadas, de acordo com a sua função biológica, em oito classes: citoesqueleto e proteínas associadas (38%), crescimento celular e reguladores de proliferação (14%), proteínas com função de ligação/transporte (14%), proteínas de membranas associadas com múltiplas atividades (14%), enzimas metabólicas (5%), degradação proteica (5%), detoxificação e proteínas redox (5%) e chaperonas moleculares (5%) (Gráfico 1)

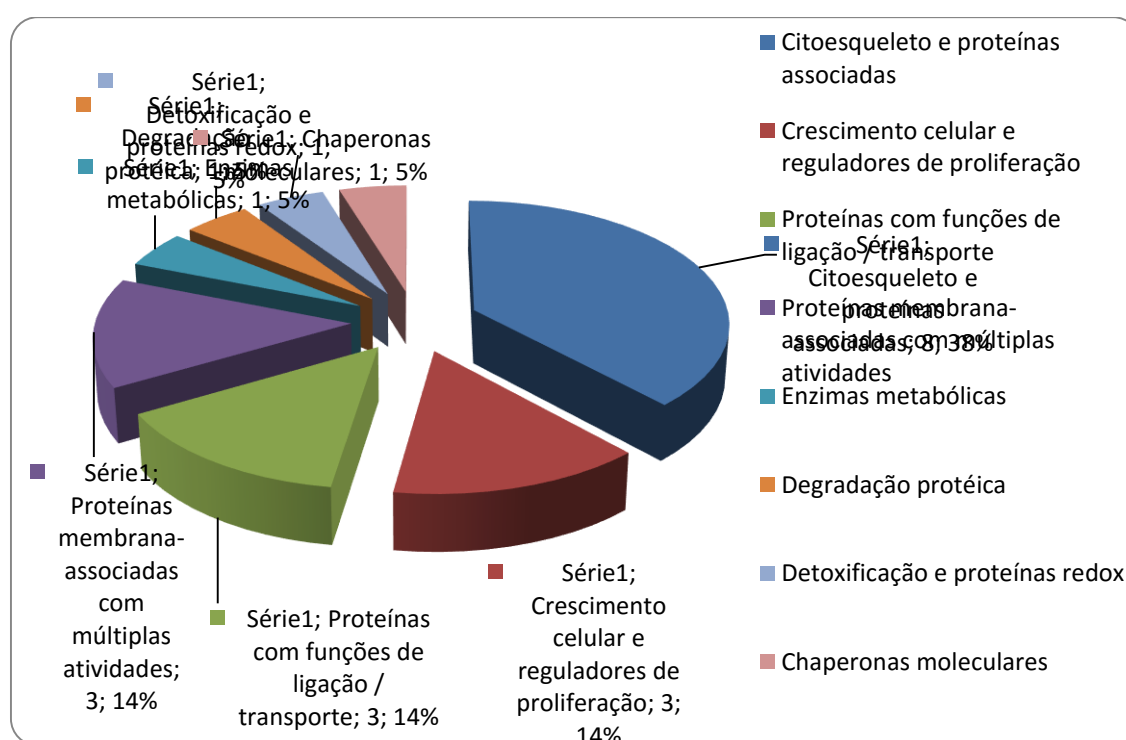


GRÁFICO 1 - Classificação quanto a função biológica das proteínas identificadas.
FONTE: O autor, 2013.

A maioria das proteínas encontradas está classificada como de citoesqueleto e associadas. O citoesqueleto é um sistema altamente complexo e associado com funções importantes dentro da célula, tais como movimento, adesão, polaridade, transporte intracelular e transdução de sinal (MINAFRA *et al*, 2006). As proteínas deste grupo foram: actina citoplasmática 1 (ACTB), actina citoplasmática 2 (ACTG), proteína *heat shock* beta-1 (HSPB1), queratina do citoesqueleto tipo 1 - 19 (K1C19), queratina do citoesqueleto – tipo 2

(K2C7), inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1), proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP) e vimentina. Destas, a vimentina foi a proteína mais abundante, sendo identificada em seis *spots*. A vimentina é um marcador de células mesenquimais e a sua alta expressão está associada à transição epitelial-mesenquimal, no qual as células perdem seu fenótipo epitelial e passam a expressar características de células mesenquimais. Esta mudança no perfil de expressão resulta no aumento da motilidade, na perda da adesão e polaridade celular e na aquisição de propriedades invasivas (MARKIEWICZ *et al.*, 2012). A segunda proteína mais abundante nesta classe foi a *heat shock* beta-1 (HSPB1). Diversos estudos têm indicado que a superexpressão de HSPB1 é um confiável biomarcador de pior prognóstico em tumores de mama, próstata, colorretal e melanoma (VASILJEVIC *et al.*, 2013). No câncer de mama é capaz de interagir com as proteínas da família MAPKs (CAYADO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2013).

Em metade dos *spots* no qual foi identificada, a vimentina apresentou-se dentro dos parâmetros utilizados para identificação. Quanto aos valores de $\Delta MM/\Delta pI$, em três dos *spots* com identificação positiva, os valores de ΔMM encontraram-se fora dos parâmetros, o que pode ser explicado por uma possível ocorrência de fosforilação nos resíduos de serina, treonina e tirosina, além de acetilação nos resíduos de lisina e serina ao qual estão submetidas. Quanto à *heat shock* beta-1 apresentou um bom *score* e percentual de cobertura na maioria dos *spots* identificados, no entanto, no *spot* 5 teve um desvio nos valores de $\Delta MM/\Delta pI$ e no *spot* 6 no valor de ΔMM . Esta proteína pode sofrer fosforilação nos resíduos de serina e acetilação em lisina, podendo justificar o desvio nos valores encontrados. Nestes *spots* foi observada também uma baixa cobertura dos peptídeos, dentre os 22 obtidos na espectrometria de massa (MS) apenas oito foram pareados no banco de dados.

A segunda classe mais abundante foi a de proteínas de crescimento celular e proliferação. Neste trabalho correspondem a 14% do total de *spots* identificados. Nesta classe estão incluídas a proteína 14-3-3 zeta (1433Z), proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1) e proibitina (PHB).

A proibitina é uma proteína expressa na maioria dos tecidos. Alterações nos seus níveis têm sido associadas a processos inflamatórios,

doenças autoimunes, obesidade e câncer. Em tumores de mama, fígado, estômago, esôfago, ovário, bexiga, tireoide e próstata há um aumento nos níveis de proteína circulante (THEISS e SITARAMAN, 2011). A proibitina é capaz de interagir com p53, E2F e pRB (MISHRA *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-QUILES *et al.*, 2012), proteínas que estão envolvidas no reparo e controle do ciclo celular.

A proibitina 7 foi identificada em dois *spots* nos quais obteve padrões de identificação satisfatórios. No *spot* 25 o valor de ΔpI obtido foi acima do valor tido como padrão, indicando que esta proteína não foi encontrada no local esperado.

Outra classe identificada foi a das proteínas com funções de ligação e transporte, encontradas em 14% dos *spots* identificados. Estão incluídas neste grupo a proteína de ligação solúvel NSF alfa (SNAA), albumina sérica (ALBU) e ligante de vitamina D (VTDB).

Nesta classe as proteínas apresentaram valores de *score* e percentuais de cobertura satisfatórios para a sua identificação, apenas a albumina obteve um baixo percentual de cobertura, no entanto o *score* e o número de peptídeos sobrepostos garantiram a sua identificação. Todas apresentaram valores satisfatórios com relação ao ΔMM e ΔpI .

As proteínas associadas à membrana foram encontradas em 14% do total de *spots* identificados. Neste conjunto foram encontradas as proteínas: anexina (ANXA 1), proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5) e prelamina-A/C (LMNA). As enzimas metabólicas corresponderam a 5% do número de *spots* identificados. A proteína identificada nesta classe foi a aminociclase 1 (ACY1). Constituíram cerca de 5% do total de proteínas identificadas e é representada pela subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5). As enzimas de detoxificação e proteínas redox são enzimas que atuam no catabolismo celular e manutenção da homeostase celular e do organismo. Neste trabalho correspondeu a 5% do total de *spots* identificados. A proteína classificada dentro desta classe foi a glutational S-transferase omega-1 (GSTO1). As chaperonas moleculares corresponderam a 3% do total de *spots* identificados neste trabalho e a proteína aqui classificada foi a endoplasmina (ENPL).

Nesta análise foram encontradas 21 diferentes proteínas em 31 *spots* identificados. Destas, 18 foram identificadas no tumor primário (em 25 *spots* identificados) e cinco no linfonodo axilar metastático (em seis *spots* identificados). Duas proteínas (*heat shock* e vimentina) foram encontradas nos dois tipos de tecidos. Nove das proteínas identificadas no tecido tumoral (resultantes de 16 dos 25 *spots*) eram exclusivas, ou seja, não foram identificadas nos linfonodos. Nestes, duas proteínas foram exclusivas, em três *spots* de seis identificados.

As proteínas que sofreram variação em $\Delta MM/\Delta pI$ podem ter sofrido ação de modificações pós-traducionais (MPT). Estas modificações podem resultar na mudança das propriedades físico-químicas, estabilidade, atividade, e consequentemente, na função. Além disso, podem alterar os valores de MM e pI (DUPONT *et al.*, 2005; MILIOLI, 2011).

Conclusão

As proteínas identificadas nesta análise proteômica comparativa entre tumores primários e linfonodos axilares metastáticos, em sua maioria estão diretamente associadas ao citoesqueleto, crescimento e proliferação celular, o que indica que atuem de forma ativa nos processos que resultam em metástase e, portanto, na progressão tumoral.

Metástase para linfonodos axilares é uma etapa inicial e fundamental no processo de progressão tumoral e está associada com um prognóstico ruim. A identificação de proteínas diferencialmente expressas entre os dois tecidos abre a possibilidade de identificação de marcadores de progressão que poderão ser utilizados no monitoramento destas pacientes.

Referências

ACHARYYA, S.; OSKARSSON, T.; VANHARANTA, S.; MALLADI, S.; KIM, J.; MORRIS, P. G.; MANOVA-TODOROVA, K.; LEVERSHA, M.; HOGG, N.; SESHAN, V.E.; NORTON, L.; BROGI, E.; MASSAGUE, J. **A CXCL1 PARACRINE NETWORK LINKS CANCER CHEMO RESISTANCE AND METASTASIS**. CELL, v. 150, p. 165-178, 2012.

BOMBONATI, A.; LERWILL, M.F. **METASTASES TO AND FROM THE BREAST**. SURGICAL PATHOLOGY, v. 5, p. 719-747, 2012.

BRADFORD, M.M. **A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING**. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, v. 72, p 248-254, 1976.

CAYADO-GUTIÉRREZ, N.; MONCALERO, V.L.; ROSALES, E.M.; BERÓN, W.; SALVATIERRA, E.E.; ALVAREZ-OLMEDO, D.; RADRIZZANI, M.; CIOCCA, D.R. **DOWNREGULATION OF Hsp27 (HSPB1) IN MCF-7 HUMAN BREAST CANCER CELLS INDUCES UPREGULATION OF PTEN**. CELL STRESS AND CHAPERONES, v. 18, p.243-249, 2013.

DUPONT, A.; CORSEAU, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A.; SUSEN, S.; VINCENTELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. **THE PROTEOME AND SECRETOME OF HUMAN ARTERIAL SMOOTH MUSCLE CELLS**. PROTEOMICS, v. 5, p. 585–596, 2005.

EXPASY. DISPONÍVEL EM <[HTTP://WWW.EXPASY.CH/](http://www.expasy.ch/)> ACESSO EM MARÇO DE 2013.

GALVÃO, E.R.C.G.N.; MARTINS, L.M.S.; IBIAPINA, J.O.; ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.H. **BREAST CANCER PROTEOMICS: A REVIEW FOR CLINICIANS**. JOURNAL CANCER RESEARCH CLINICAL ONCOLOGY. v. 137, p. 915–925, 2011.

HAO, X.; SUN, B.; HU, L.; LÄHDESMÄKI H.; DUNMIRE, V.; FENG, Y.; ZHANG, S.; WANG, H.; WU, C.; WANG, H.; FULLER, G.N.; SYMMANS, W.F.; SHMULEVICH, I.; ZHANG, W. **DIFFERENTIAL GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN PRIMARY BREAST MALIGNANCIES AND THEIR LYMPH NODE METASTASES AS REVEALED BY COMBINED cDNA MICROARRAY AND TISSUE MICROARRAY ANALYSIS.** CANCER, v. 100, p.1110-22, 2004.

HOLM, K.; HEGARDT, C.; STAAF, J.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; JÖNSSON, G.; OLSSON, H.; BORG, H.; RINGNÉR, M. **MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER ARE ASSOCIATED WITH CHARACTERISTIC DNA METHYLATION PATTERNS.** BREAST CANCER RESEARCH, v.12, p. 1-16, 2010.

MALINOWSKY, K.; RAYCHAUDHURI, M.; BUCHNER, T.; THULKE, S.; WOLFF, C.; HÖFLER, H.; BECKER, K.; AVRIL, S.; **COMMON PROTEIN BIOMARKERS ASSESSED BY REVERSE PHASE PROTEIN ARRAYS SHOW CONSIDERABLE INTRATUMORAL HETEROGENEITY IN BREAST CANCER TISSUES.** PLUS ONE, v. 7, 2013. DISPONÍVEL EM
 <[HTTP://WWW.PLOSONE.ORG/ARTICLE/INFO%3ADOI%2F10.1371%2FJOURNAL.PONE.0040285](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0040285)> ACESSO REALIZADO EM ABRIL DE 2013.

MARKIEWICZ, A.; AHREND, T.; WEŁNICKA-JAŚKIEWICZ, M.; SEROCZYŃSKA, B.; SKOKOWSKI, J.; JAŚKIEWICZ, J.; SZADE, J.; BIERNAT, W.; JŹACZEK, A. **EXPRESSION OF EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION-RELATED MARKERS IN LYMPH NODE METASTASES AS A SURROGATE FOR PRIMARY TUMOR METASTATIC POTENTIAL IN BREAST CANCER.** JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, v.10, 2012.

MILIOLI, H.H.Z. **ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E METÁSTASES AXILARES CORRESPONDENTES.** 2011. 219 F DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NA ÁREA DE

GENÉTICA) – DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2011.

MINAFRA, I.P.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A.; MINAFRA, S. **EXPANDING THE PROTEIN CATALOGUE IN THE PROTEOME REFERENCE MAP OF HUMAN BREAST CANCER CELLS**. *PROTEOMICS*, v. 6, p. 2609–2625, 2006.

MISHRA, S.; MURPHY, B.L.G.; NYOMBA, G.; MURPHY, L.J. **PROHIBITIN: A POTENTIAL TARGET FOR NEW THERAPEUTICS**. *MOLECULAR MEDICINE*, v.11, p. 192-197, 2005.

RAY, S.; REDDY, P. J.; JAIN, R.; GOLLAPALLI, K.; MOIYADI, A.; SRIVASTAVA, S. **PROTEOMIC TECHNOLOGIES FOR THE IDENTIFICATION OF DISEASE BIOMARKERS IN SERUM: ADVANCES AND CHALLENGES AHEAD**. *PROTEOMICS*, v. 11, p. 2139-2161, 2011.

SÁNCHEZ-QUILES, V.; SEGURA, V.; BIGAUD, E.; HE, B.; O'MALLEY, B.W.; SANTAMARÍA, E.; PRIETO, J.; CORRALES, F.J. **PROHIBITIN-1 DEFICIENCY PROMOTES INFLAMMATION AND INCREASES SENSITIVITY TO LIVER INJURY**. *JOURNAL OF PROTEOMICS*, v. 75, p.5783–5792, 2012.

TAN, H.T.; LEE, Y.H.; CHUNG, M.C.M. **CANCER PROTEOMICS**. *MASS SPECTROMETRY REVIEWS*, v. 31, p. 583-605, 2012.

TONG TAN, H.; HOU LEE, Y.; CHUNG, M.C.M. **CANCER PROTEOMICS**. *MASS SPECTROMETRY REVIEWS*, v. 31, p. 583-605, 2012.

THEISS, A.L.; SITARAMAN, S.V. **THE ROLE AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF PROHIBITIN IN DISEASE**. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, v.1813, p. 1137-1143, 2011.

UNIPROTKB. **UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE.** DISPONÍVEL EM
 <[HTTP://WWW.UNIPROT.ORG/UNIPROT/](http://www.uniprot.org/uniprot/)> ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

VASILJEVIC', N.; AHMAD, A.S.; BEESLEY, C.; THORAT, M.A.; FISHER, G.;
 BERNEY, D.M.; MØLLER, H.; YU, Y.; LU, Y-L.; CUZICK, J.; FOSTER, C.S.;
 LORINCZ, A.T. **ASSOCIATION BETWEEN DNA METHYLATION OF HSPB1 AND DEATH
 IN LOW GLEASON SCORE PROSTATE CANCER.** PROSTATE CANCER AND PROSTATIC
 DISEASE, V. 16, P. 35–40, 2013.

VELASCO-VELÁZQUEZ, M.; JIAO, X.; DE LA FUENTE, M.; PESTELL, T.G.;
 ERTEL, A.; LISANTI, M.P.; PESTELL, R.G. **CCR5 ANTAGONIST BLOCKS
 METASTASIS OF BASAL BREAST CANCER CELLS.** CANCER RESEARCH, V.72, N. 15, P.
 3839–3850, 2012.

WARMOES, M.; JASPERS, J.E.; PHAM, T.V.; PIERSMA, S.R.; OUDGENOEG,
 G.; MASSINK, M.P.G.; WAISFISZ, Q.; ROTTENBERG, S.; BOVEN, E.;
 JONKERS, J.; JIMENEZ, C.R. **PROTEOMICS OF MOUSE BRCA1-DEFICIENT
 MAMMARY TUMORS IDENTIFIES DNA REPAIR PROTEINS WITH DIAGNOSTIC AND
 PROGNOSTIC VALUE IN HUMAN BREAST CANCER.** MOLECULAR & CELLULAR
 PROTEOMICS, V. 11, 2012. DISPONÍVEL EM <
[HTTP://WWW.MCPONLINE.ORG/CONTENT/11/7/M111.013334.FULL.PDF+HTML?SID=B0
 182CC7-A813-408E-9DAA-CCA02884343D](http://www.mcponline.org/content/11/7/M111.013334.full.pdf+html?SID=B0182CC7-A813-408E-9DAA-CCA02884343D)>. ACESSO EM SETEMBRO DE 2012.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O câncer de mama consiste em um conjunto de doenças heterogêneas com biologia, comportamento clínico e resposta ao tratamento distintos (JONES *et al.*, 2012).

A doença metastática é a maior causa de mortalidade em pacientes com câncer de mama, pela resistência às terapias convencionais e experimentais. Por isso, é necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de identifica-la precocemente ou logo após a disseminação (GRIFFITH e GRAY, 2011).

Dos estudos gerados pelo epigenoma, genoma, transcriptoma e proteoma, as mudanças ocorridas durante a progressão tumoral até a metástase tem sugerido a existência de alguns possíveis marcadores que possam ser utilizadas na detecção precoce de metástase. Entre os processos estão incluídas mudanças na mobilização, invasão, angiogênese, transição epitelial-mesenquimal, remodelamento vascular, intravasão, extravasão e colonização do órgão (GRIFFITH e GRAY, 2011).

A identificação de proteínas é, portanto, crucial para o entendimento dos processos biológicos normais de uma célula, bem como os patológicos que resultam em doenças, entre elas o câncer (LI *et al.*, 2012).

Dentre as ferramentas atualmente existentes, a proteômica tem sido amplamente utilizada na identificação de proteínas chaves e na mensuração dos níveis de expressão proteica associada aos processos biológicos e patológicos (SZABO *et al.*, 2012). A aplicação no estudo de doenças humanas e a utilização na clínica resultaram na busca por marcadores que possam auxiliar na detecção precoce e no diagnóstico do câncer e da doença metastática (SAVINO *et al.*, 2012).

Este estudo complementou aquele iniciado na Dissertação de Mestrado de Heloisa Helena Zaccaron Milioli, que realizou análise das proteínas com nível de significância até 0,02 ($p < 0,02$). O objetivo inicial (correspondente aos resultados apresentados no Capítulo I) era analisar as proteínas com p entre 0,02 e 0,05. No entanto, foram incluídas também proteínas com $p < 0,02$ cujos

spots correspondentes ainda não haviam sido excisados e analisados no estudo anterior ou que apresentaram identificação suspeita. Algumas proteínas coincidem com as identificadas por Milioli (2011) demonstrando que podem ter sofrido alguma modificação pós-traducional ou pode se tratar de alguma isoforma distinta da encontrada anteriormente.

6.1. Identificação proteica

Neste trabalho, foram utilizadas sete amostras de tumor primário e respectivo linfonodos axilar metastático, no entanto uma das amostras não gerou picos que possibilitassem a identificação de proteínas. Ao final, 116 *spots* foram submetidos aos procedimentos para identificação proteica, resultando em 44 identificações positivas, que corresponderam a 33 proteínas diferentes. Dentre estas, 21 foram identificadas no nível de significância de $0,02 < p < 0,05$. Uma segunda identificação foi realizada para os *spots* que não apresentaram resultados positivos e/ou cuja identificação foi suspeita no trabalho de Milioli, com nível de significância inferior a 0,02. Nesta análise foram identificadas 14 proteínas diferentes para os 13 *spots* analisados.

A metodologia mostrou-se eficiente, no entanto a concentração proteica não foi satisfatória para que outras proteínas pudessem ser identificadas, principalmente porque a maioria dos *spots* selecionados foi proveniente de géis previamente preparados. Isto refletiu na baixa concentração de peptídeos resultantes da digestão enzimática.

Os picos gerados pelo MS não se mostraram satisfatórios para a identificação no MASCOT na maioria dos *spots* analisados devido ao baixo *score* apresentado por eles. Com o método de concentração foi possível à identificação de proteínas, no entanto, em alguns *spots* não foram detectados picos, mesmo utilizando os protocolos de concentração e purificação peptídica.

Além da concentração dos fragmentos peptídicos, a obtenção de espectros de massa satisfatórios está sujeita a variáveis como as calibrações externa (MALDI) e interna (*FlexAnalysis*) e intensidade do laser que variou de acordo com o *spot* analisado. A presença de contaminantes, sinais de matriz e

quantidade de ruído também podem interferir no padrão de picos de massa, comprometendo as informações a serem comparadas nos bancos de dados.

Os parâmetros utilizados na identificação no MASCOT incluíram *score*, percentual de cobertura de sequência e número de peptídeos sobrepostos. Para que a identificação seja confiável os valores obtidos nestes parâmetros devem ser satisfatórios. Para o *score* admitem-se valores acima de 56, o percentual de cobertura acima de 20%. No entanto, caso alguns destes esteja não seja satisfatório, os outros dois suportam a identificação, caso apresentem bons valores.

Baseado no trabalho de *Dupont et al* (2005), as diferenças entre os valores teóricos e observados de massa molecular e ponto isoelétrico foram avaliados conforme os parâmetros $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pl < 0,6$. Este parâmetro informa com uma maior confiabilidade que as proteínas e seus respectivos *spots* estão localizados no gel na posição esperada. Dos 44 *spots* identificados 56,81% estavam presentes no local observado. Dentre aqueles inseridos no nível de significância de $0,02 < p < 0,05$ 54,84% dos *spots* se encontravam no local esperado, e nos *spots* com nível de significância abaixo de 0,02 69,23% dos *spots* foram localizados no local esperado.

A diferença na quantidade de proteínas identificadas quando comparadas ao número de *spots* identificados é explicada pela presença de uma mesma proteína em diferentes *spots*, este fato decorre da presença de isoformas de uma mesma proteína ou de modificações pós-traducionais (MTP) as quais as proteínas estão sujeitas. Estas modificações podem resultar na mudança das propriedades físico-químicas, estabilidade, atividade, e consequentemente, na função. Além disso, podem alterar os valores de MM e pl (DUPONT *et al.*, 2005; MILIOLI, 2011).

6.2. Classificação funcional das proteínas ($0,02 < p < 0,05$)

Os trabalhos em proteômica realizados no LabCHO utilizam como critério de classificação o trabalho de *Minafra et al.*(2006) juntamente com as informações obtidas na literatura e nos bancos de dados do NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *UniProtKB/Swiss-Prot*. De acordo com isso as proteínas foram classificadas baseando-se na sua função biológica em 8 classes: citoesqueleto e proteínas associadas (38%), crescimento celular e reguladores de proliferação (14%), proteínas com função de ligação/transporte (14%), proteínas de membranas associadas com múltiplas atividades (14%), enzimas metabólicas (5%), degradação proteica (5%), detoxificação e proteínas redox (5%) e chaperonas moleculares (5%) (Tabela 2).

6.2.1. Citoesqueleto e proteínas associadas

O citoesqueleto é um sistema altamente complexo e dinâmico e inclui proteínas estruturais como a tubulina, actina e filamentos intermediários, bem como várias proteínas associadas com funções regulatórias. Além de ser o responsável pela estrutura e forma da célula, o citoesqueleto está diretamente e indiretamente envolvido em diversos processos celulares importantes como movimento, adesão, polaridade, transporte intracelular e transdução de sinal (MINAFRA et al, 2006).

Neste trabalho 38% do total de *spots* identificados foram classificados como proteínas de citoesqueleto e associadas. As proteínas deste grupo consistiram a actina citoplasmática 1 (ACTB), actina citoplasmática 2 (ACTG), proteína heat shock beta-1 (HSPB1), queratina do citoesqueleto 19 tipo 1 (K1C19), queratina do citoesqueleto 7 – tipo 2 (K2C7), inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1), proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP) e vimentina (VIME).

As actinas são proteínas altamente conservadas e são ubiquitariamente expressas em células eucarióticas. Estão envolvidas na motilidade celular, estrutura e integridade (BIN GOH *et al.*, 2012). As actinas citoplasmáticas 1 e 2 são codificadas pelos genes ACTB mapeado em 7p22 e ACTG mapeado em 17q25 respectivamente (*UniProtKB*, 2013). Apresentam grande similaridade, diferindo em apenas quatro aminoácidos na região amino-terminal, o que explica sua identificação nos *spots* 1 e 2, com os mesmos

valores de *score*, valor de MM e pI, cobertura de sequência e número de massas pareadas. Ao final foram consideradas na contagem de proteínas, e para distinção seria necessária a obtenção da sequência de aminoácidos através de espectrometria de massas em tandem (MS/MS).

Quanto aos critérios de identificação ambos os *spots* apresentaram valores satisfatórios. Em relação aos valores de $\Delta MM/\Delta pI$ o *spot* 1 teve valores satisfatórios, no entanto em 2, ambas proteínas diferiram quanto aos parâmetros de $\Delta MM/\Delta pI$. Os *spots* 1 e 2 são oriundos de tecidos tumorais, no entanto de amostras diferentes (CP 645 T e CP 641 T, respectivamente). Em ambos apresentaram-se como exclusivos dentro deste tecido quando comparados com o linfonodo.

As proteínas ACTB/G sofrem modificações pós-traducionais como acetilação (nos resíduos de metionina, glutamato e aspartato), metilação (resíduo de histidina), oxidação, fosforilação (resíduo de tirosina) apresentando-se em apenas 1 isoforma (*UniProtKB*, 2013). Em ambos os *spots* foram encontradas as mesmas proteínas, no entanto, elas diferiram quanto aos valores de $\Delta MM/\Delta pI$. Isto pode ser explicado pelas diferentes MPT ao qual estão submetidas, além disso, por se tratar de amostras diferentes, há uma heterogeneidade entre elas. O câncer de mama por se tratar de um conjunto de doenças heterogêneas, apresenta heterogeneidade intratumoral, entre as células tumorais e os compartimentos do estroma. Assim, dependendo desta heterogeneidade podem existir, dentro de um mesmo tumor, células que sejam menos responsivas a um determinado tratamento, ou células que sejam mais propensas a se disseminar do que outras. Além disso, podem apresentar “heterogeneidade temporal”, apresentando-se em diferentes estágios durante sua evolução (RODENHISER *et al.*, 2011).

A proteína *heat shock* beta-1 (HSPB1) também denominadas HSPB27 é codificada pelo gene *HSPB1* localizado em 7q11.23. É um membro da pequena família *heat shock*. Biologicamente é uma proteína anti-apoptótica que induz a homeostase intracelular e permite a regeneração celular e a recuperação após estresses físicos e químicos. Embora seja constitutivamente expressa nas células, em baixos níveis, o aumento da expressão durante a

carcinogênese resulta na sobrevivência das células cancerosas (GIBERT *et al.*, 2012; VASILJEVIC *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm indicado que a superexpressão de HSPB1 é um confiável biomarcador de prognóstico desfavorável em tumores de mama, próstata, colón e reto e melanoma (VASILJEVIC *et al.*, 2013). Devido a isso, é referenciado como alvo terapêutico, já que este aumento na expressão resulta em um aumento da agressividade do tumor, na ausência de resposta às terapias e também em um prognóstico desfavorável dos pacientes (GIBERT *et al.*, 2012).

Em tumores de mama, a HSPB1 é superexpressa e pode interagir com diversas proteínas. Em tecidos cancerosos mamários humanos e linhagens celulares de câncer de mama em roedores, foi descrita a interação desta com β -catenina e com HSF1. No estudo de Gibert *et al.* (2012), foi observada uma degradação de histonas desacetilase HDAC6, do fator de transcrição STAT2 e da procaspase 3 em células cancerosas humanas no qual houve redução dos níveis desta proteína, sugerindo que estas proteínas se associem de fato com a HSPB1. Além disso, a baixa regulação resulta em senescência celular nas células cancerosas que tem sido associada à ativação da via p53 e p21 (CAYADO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2013).

A proteína HSPB27 também é descrita como componente central da cascata de sinalização Akt: Akt \rightarrow BAD \rightarrow FKHR \rightarrow Hsp27, e consequentemente tem sua ação influenciada pelo PTEN, que é um supressor tumoral que regula negativamente a via de sinalização PI3K/Akt (CAYADO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2013).

Neste trabalho, a HSPB1 apresentou-se exclusivamente expressa tanto em tecidos de tumor primário (*spot* 3) como linfonodo axilar metastático (*spots* 4, 6), no *spot* 5, em uma amostra tumoral, apresentou-se diferencialmente expressa quando comparada com o tecido do linfonodo ($p < 0,05$). Os valores atribuídos à identificação mostraram-se satisfatórios, o que permitiu uma boa identificação desta proteína. Em relação aos valores de $\Delta MM/\Delta pl$ algumas divergências foram encontradas entre as amostras. O único *spot* divergente em relação aos dois parâmetros foi o 5 revelando que o *spot* não estava localizado na posição esperada. Os *spots* 3 e 6 apresentaram valores divergentes quanto

ao Δ MM. Assim como as actinas, HSPB1 também sofre MPT, neste caso fosforilação em resíduos de serina por MAPKAPK2, MAPKAPK3 e MAPKAPK5, e acetilação nos resíduos de lisinas (*UniProtKB*, 2013). Estas modificações podem resultar na mudança dos valores de MM e pI de uma proteína. O *spot* 4 apresentou-se dentro dos parâmetros analisados.

As citoqueratinas são proteínas encontradas no citoplasma de células epiteliais. Participam como componente fundamental do citoesqueleto, sendo responsável pela manutenção da estrutura das células e tecidos, protegendo-as contra traumas mecânicos, permitindo também a interação entre as células adjacentes (JACQUES *et al.*, 2009).

As citoqueratinas tipo I são ácidas e arranjadas aos pares nas cadeias de queratinas. As citoqueratinas do tipo II são neutras a básicas (*UniProtKB*, 2013).

A queratina do citoesqueleto 19 tipo 1 (K1C19) é codificada pelo gene *KRT19* e está localizada em 17q21.2 (PAIVA *et al.*, 2011). A K1C19 sofre fosforilação em resíduos de serina e tirosina (*UniProtKB*, 2013).

A K1C19 foi encontrada em dois *spots* (7, 8) em uma amostra tumoral apresentando-se exclusivamente expressa neste tecido. Os parâmetros utilizados para a identificação mostraram-se satisfatórios, divergindo apenas no percentual de cobertura apresentado pelo *spot* 7, abaixo do valor tido como padrão (20%) embora tenha sido um valor próximo a este. No entanto, o número de peptídeos sobrepostos foi satisfatório, o que garante a confiabilidade da identificação. Os valores encontrados para Δ MM/ Δ pI não divergiram, indicando que os mesmos foram encontrados nos locais esperados.

A queratina do citoesqueleto 7 tipo 2 (K2C7) é uma proteína de filamento intermediário e é codificada pelo gene *KRT7* localizado em 12q13.13 e é um marcador imunohistoquímico em tumores epitelial renal (OZCAN, 2012). É usualmente expressa em epitélios normal de pulmão, bexiga, e é raramente observada nas glândulas intestinais e gástricas (GURZU e JUNG, 2012). É uma proteína de baixo peso molecular, e sua expressão foi observada na maioria dos casos de carcinomas, com exceção daqueles que surgem a partir do cólon, próstata, rim, timo, tumores do pulmão e de origem do trato gastrointestinal (CHU *et al.*, 2000).

Foi encontrada no linfonodo no *spot* 9 apresentando-se como exclusiva. Os valores utilizados como parâmetro para a identificação proteica mostraram-se satisfatórios bem como os valores de $\Delta MM/\Delta pl$.

A K2C7 é fosforilada e acetilada nos resíduos de serina, metilada e demetilada nos resíduos de arginina. Participa dos processos de replicação do DNA, organização do citoesqueleto, regulação da transcrição e na interfase (UniProtKB, 2013).

A proteína inibidora de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1) é uma proteína celular regulatória codificada pelo gene *ARHGDI1*, localizado em 17q25.3, pertence à família das GDIs (inibidores da dissociação do nucleotídeo guanina) e está diretamente relacionada com a regulação do ciclo GDP/GTP e inibição do oncogene Rho (MAN-NI *et al.*, 2007; COSTA, 2010). A Rho está inserida dentro da família RAS que compreende 22 genes humanos, no qual Rho, Rac e Cdc42 são os melhores caracterizados. Através da regulação da actina no citoesqueleto, as proteínas Rho-GTPases controlam as mudanças na morfologia celular e motilidade através de sinais extracelulares (MAN-NI *et al.*, 2007). A maioria das Rho-GTPases alterna entre a forma ativa (GTP-ligado) e inativa (GDP-ligado) e este ciclo é regulado pelos fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs) e pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), além das GDIs (COSTA, 2010).

Rho GDP é expressa nas células e tecidos e liga-se a maioria das proteínas Rho-GTPases incluindo Rac1, RhoA, e Cdc42. Postula-se que a regulação negativa realizada por GDIR1 seja exercida de três formas: (a) restringindo a ação das GTPases restringindo sua localização ao citosol, onde encontra-se inativa; (b) impedindo sua ligação com os fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs); (c) bloqueando a ligação a alvos moleculares *downstream* (ZHANG *et al.*, 2005).

Em várias linhagens celulares, a superexpressão induz a desligamento das actinas do citoesqueleto e a perda da aderência ao substrato (ZHANG *et al.*, 2005).

Identificada no *spot* 10, mostrou-se exclusivamente expressa no tecido tumoral satisfazendo os parâmetros utilizados para a identificação proteica na plataforma MASCOT. Apresentou pequena divergência em ΔMM com valor

superior a 20%. A GDIR1 sofre acetilação nos resíduos de alanina e lisina. A acetilação corresponde à adição de um grupo acetil (CH₃CO) em um composto orgânico carregado, modificando o valor de pI (MILIOLI, 2011), o que não foi observado neste caso.

A proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP) também denominada fortilina, TPT1, P21, P23 é expressa em vários tecidos. É codificada pelo gene *TPT1* localizado em 13q14.13. Não apresenta homologia com nenhuma outra proteína. É altamente regulada transcricional e traducionalmente por uma gama de sinais extracelulares (BATISTI *et al.*, 2012; NAGANO-ITO e ICHIKAWA, 2012).

Embora tenha sido a primeira proteína de tumor descrita, a TCTP é também encontrada em células normais. Desempenha atividades importantes intra e extracelular como crescimento celular, progressão do ciclo celular, divisão e proliferação. A função anti-apoptótica também foi descrita em células humanas, em associação ao p53, previne a apoptose por desestabilização desta proteína (BATISTI *et al.*, 2012).

Além disso, é capaz de interagir com o citoesqueleto por meio de ligações às tubulinas e actinas. A sua superexpressão resulta no atraso do crescimento celular, na estabilização de microtúbulos e em alterações da morfologia das células (BOMMER, 2012).

No estudo de Bommer (2012) foi verificado que as TCTP também estão envolvidas na estabilização das fibras dos microtúbulos, e que a separação destas é bastante importante para a transição metáfase-anáfase. A separação ocorre pela fosforilação da TCTP pelas proteínas quinases tipo polo mitótico (P1k-1).

A TCPT também atua como uma proteína *heat shock* tipo chaperona, pois pode ligar as proteínas desnaturadas, renaturando-as, ou a proteínas ativas protegendo-as da degradação (NAGANO-ITO e ICHIKAWA, 2012).

Muitos estudos indicam que a TCTP pode induzir a tumorigênese, e que atue como um oncogene (NAGANO-ITO e ICHIKAWA, 2012).

Neste trabalho, a TCTP foi encontrada no *spot* 11 com expressão diferencial no tumor e linfonodo, apresentou-se com maior expressão no primeiro tecido (p<0,02). O valor encontrado para o *score* foi satisfatório, e o

percentual de cobertura ficou próximo a 20%, além disso, o número de peptídeos sobrepostos foi satisfatório. Portanto os valores encontrados aumentam o grau de confiabilidade da identificação. O valor de Δpl foi condizente com o esperado, mas o de ΔMM desviou-se em relação ao padrão estabelecido, o que pode ser explicado pela fosforilação que pode ocorrer nos resíduos de serina por PLK1, uma tirosina quinase que realiza importantes funções na mitose (*UniProtKB*, 2013).

A vimentina (VIME) é codificada pelo gene *VIM* (vimentin) e está localizado em 10p13 e apresenta MM e pl esperados de 53,68 kDA e 5,06, respectivamente (MILLIOLI, 2011). É uma proteína de filamentos intermediários, normalmente expressa em células mesenquimais, mas também encontrada em células epiteliais quando estas estão em transição epitelial-mesenquimal, um evento fundamental na progressão metastática. Nesta fase há a redução dos marcadores epiteliais como a E-caderina e alta expressão de marcadores mesenquimais como a N-caderina e a vimentina (NODALE *et al.*, 2012). Participa da formação estrutural do citoesqueleto, está envolvida no processo de resposta imune e na estabilização do mRNA do colágeno (ULIRSCH *et al.*, 2013).

Em estudos com linhagens celulares de carcinomas invasivos a indução de vimentina é correlacionada com prognóstico desfavorável. A relevância funcional da superexpressão de vimentina foi observada através da correlação do aumento de genes associados à TEM e ao fenótipo *basal-like*, por meio de análise de microarranjos (NODALE *et al.*, 2012).

Neste trabalho, a vimentina foi identificada em seis *spots* (15-20), sendo que em quatro *spots* foi observada a expressão exclusiva desta proteína (15, 16, 17 e 19) em diferentes amostras de tumor. Em dois *spots* apresentou-se como diferencialmente expressa, metade na amostra tumoral e a outra metade composta na amostra de linfonodo. Os valores necessários à identificação e confiabilidade da mesma mostraram-se satisfatórios. Os valores de Δpl também foram condizentes com o esperado em todas as amostras no qual houve identificação para esta proteína, no entanto, em três houve divergência quanto a ΔMM (16,17,18).

A vimentina sofre fosforilação nos três resíduos (serina, treonina e tirosina), e acetilação nos resíduos de lisina e serina, e é uma proteína central no processo de transição epitelial-mesenquimal, e um dos mais importantes marcadores deste evento. Está superexpressa em diversos carcinomas incluindo de mama (NODALE *et al.*, 2012).

6.2.2. Crescimento celular e reguladores da proliferação

A segunda classe é composta por proteínas que estão associadas ao crescimento e regulação da proliferação celular. Corresponderam, neste trabalho a 14% do total de *spots* identificados, estão incluídas a proteína 14-3-3 zeta/delta (1433Z), proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1) e proibitina (PHB).

A 14-3-3 (1433Z) compreende uma grande família de proteínas ácidas altamente conservadas e expressas em eucariotos. Elas desempenham funções regulatórias através da ligação e modulação de proteínas-alvo, principalmente pela ligação a motivos de fosfoserina e fosfotreonina específicos (POZUELO-RUBIO, 2012). Em humanos são encontradas sete isoformas (β , γ , ζ , δ , ϵ , η , τ) sendo que cada uma é codificada por um gene diferente. (BERGAMASCHI *et al.*, 2013). Estudos proteômicos sugerem que esta família regule processos como proliferação celular, apoptose, sobrevivência, sinalização celular e dinâmica do citoesqueleto (POZUELO-RUBIO, 2012).

A proteína 14-3-3 ζ é codificada pelo gene *WHAZ* localizado em 8q22 e está frequentemente amplificada em câncer de mama (BERGAMASCHI *et al.*, 2013). Alguns estudos têm demonstrado que a proteína 14-3-3 ζ pode modular a habilidade de Ras ativar Raf, e em consequência, a via de sinalização ERK (WILKER e YAFFE, 2004). Interage com *TP53* aumentando a atividade transcricional desse gene (UniProtKB, 2013).

Neste trabalho apresentou-se diferencialmente expressa no *spot* 21 entre os tecidos do tumor primário e linfonodo metastático, com maior expressão no tecido tumoral ($p < 0,05$). Os valores de *score* e percentual de cobertura mostraram-se satisfatórios, aumentando a confiabilidade na

identificação desta proteína. O mesmo ocorreu para os parâmetros de $\Delta MM/\Delta pI$, indicando que o *spot* encontrava-se no local esperado.

A proteína 1433Z pode apresentar resíduos de treonina/serina fosforilados, e resíduos de lisina e metionina acetilados. Ambas as MPT podem alterar os valores de *pI*, o que não foi aqui observado (UniProtKB, 2013).

A proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1) é uma proteína intracelular envolvida na proliferação, diferenciação neuronal. É codificada pelo gene *DISC1* localizado em 1q42.1. Mutações no gene *DISC1*, incluindo a translocação t(1;11)(q42.1;q14.3), está fortemente associada com síndromes psicológicas como a esquizofrenia, desordens bipolar e depressão (PARK *et al.*, 2010; MARLEY e VON ZASTROW, 2010; GOUDARZI *et al.*, 2012).

A DISC é capaz de interagir com diversas proteínas, algumas responsáveis pela organização do citoesqueleto. Dentre essas, a interação com a Tensina2, que participa na localização das adesões focais, atua também como uma ponte entre o citoesqueleto e os domínios intracelulares dos receptores transmembranas, como as tirosina-quinases receptoras e β -integrinas (GOUDARZI *et al.*, 2012).

Essas interações estão relacionadas com a regulação do citoesqueleto, envolvido na motilidade celular. A desregulação desta interação tem sido observada em células cancerosas que exibem grande tendência a metastatização (GOUDARZI *et al.*, 2012).

Foi observada uma expressão diferencial entre os tecidos analisados, sendo que no linfonodo houve um aumento dos níveis proteicos ($p < 0,05$). Os parâmetros utilizados na identificação não se mostraram satisfatórios, visto que os valores de *score*, percentual de cobertura e número de peptídeos sobreposto foram baixos, o que indica que é uma proteína passível de novo análise para que se confirme sua identificação. Além disso, houve um desvio em ΔpI . Esse desvio no *pI* pode ser explicado pela presença de acetilações nos resíduos de metionina e serina e fosforilação em treonina/serina. Portanto, a confiabilidade de identificação desta proteína é baixa.

A proibitina (PHB) é uma proteína evolutivamente bem conservada que é codificada pelo gene *PHB* localizado em 17q12-q21. Está envolvida em diversos processos como controle do ciclo celular com ação anti-proliferativa,

apoptose, regulação transcricional, desenvolvimento e manutenção da função mitocondrial (MISHRA *et al.*, 2010).

É primariamente localizada nas mitocôndrias, podendo ser encontrada também no núcleo. Na mitocôndria está envolvida na manutenção da integridade bem como na proteção contra a senescência. Além disso, atua na estabilização de proteínas respiratórias recém-sintetizadas, ou seja, é importante no desenvolvimento normal da mitocôndria. No núcleo, presume-se que atue como supressor de tumor (MISHRA *et al.*, 2005; MISHRA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012).

A proibitina é expressa na maioria dos tecidos. Alterações nos níveis têm sido associadas a diversas patologias como processos inflamatórios, doenças autoimunes, obesidade e câncer. Em tumores de mama, fígado, estômago, esôfago, ovário, bexiga, tireoide e próstata há um aumento nos níveis de proteína circulante, enquanto que em gliomas há um decréscimo (THEISS e SITARAMAN, 2011). Além disso, é capaz de interagir com diversas proteínas, o que explica seu efeito pleiotrópico na célula. Existem evidências da interação de PHB com p53, E2F e pRB, evidenciando sua importância no controle do ciclo celular (MISHRA *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-QUILES *et al.*, 2012).

No câncer de mama, verificou-se que sua atuação como supressor de tumor deve-se a região 3' não traduzida do gene *PHB* que impede a transição da fase G1 para a fase S da divisão celular. Em linhagens de câncer de mama a interação com p53 induz o aumento transcricional de p53. Durante a superexpressão de Skp2B, PHB é degradada resultando na diminuição da atividade de p53 (THEISS e SITARAMAN, 2011).

Embora muitos estudos comprovem a ação anti-proliferativa da proibitina, outros indicam que a mesma atua como um oncogene devido a sua interação com RAS resultando na ativação de RAF (THEISS e SITARAMAN, 2011). Em adição, a proibitina é descrita como moduladora da via PI3K/Akt. Estas duas vias estão envolvidas diretamente no aumento do crescimento, metabolismo e diferenciação celular (MISHRA *et al.*, 2010).

Neste trabalho a proibitina foi encontrada em dois *spots* diferentes, 24 e 25 em amostras de tecido tumoral. No *spot* 24 apresentou expressão diferencial entre o tumor primário e o linfonodo axilar metastático, ($p < 0,02$), no

spot 25 apresentou-se como exclusiva. Os parâmetros utilizados para identificação foram satisfatórios, e em apenas 1 *spot* (25) houve divergência no valor de ΔpI .

Como as análises são feitas em cada paciente individualmente, esta proteína apresentou este padrão de expressão. Em alguns casos o *spot* pode se encontrar em baixa concentração não sendo captado em todos os géis pelo programa que acaba interpretando-o como exclusivo para uma determinada amostra. Este fato poderia explicar esta diferença no padrão de expressão de uma mesma proteína. Não se pode esquecer que como as análises são feitas individualmente, a heterogeneidade de cada amostra pode influenciar nos padrões de expressão das proteínas.

As proibitinas são fosforiladas nos resíduos de tirosina e acetiladas nos resíduos de lisina. Ambas as modificações podem resultar na mudança do valor de pI em relação ao teórico, o que poderia explicar a divergência encontrado no *spot* 25.

6.2.3. Proteínas com funções de ligação/transporte

Corresponderam a 14% do total de *spots* identificados. Estão inclusas neste grupo a proteína de ligação solúvel NSF alfa (SNAA), albumina sérica (ALBU) e vitamina D-ligante (VTDB).

A proteína de ligação solúvel NSF alfa (SNAA), também conhecida como proteína sensível ao fator N-etilmaleimida alfa (SNARE), é codificada pelo gene *NAPA* localizado em 19q13.33. Está envolvida no transporte entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (*UniProtKB*, 2013).

Tem sido demonstrada como sendo uma enzima essencialmente necessária para todos os eventos de transporte de membrana de uma célula, pois desempenham um papel central na geração da especificidade do transporte vesicular e na catálise do processo de fusão (MOELLER *et al.*, 2012).

As proteínas SNARE estão localizadas tanto na vesícula como na membrana alvo no qual ela atua. Recentes estudos revelaram uma ligação

entre as proteínas SNARE e o processo de apoptose. A expressão de proteínas SNARE foi observada como regulador de moléculas da via apoptótica, como p53 e as caspases, em outros casos essas proteínas suprimiam ou aceleravam a apoptose (NAYDENOV *et al.*, 2012).

Foi encontrada no *spot* 27 onde se mostrou diferencialmente expressa no tecido tumoral quando comparado ao linfonodo ($p < 0,02$). Foi identificada com alta confiabilidade, visto que atendeu os requisitos necessários a uma boa identificação. Também apresentou valores de $\Delta MM/\Delta pI$ dentro dos parâmetros estipulados por Dupont.

A albumina sérica (ALBU) tem como principal função a regulação da pressão osmótica no sangue. Além disso, é a principal transportadora de zinco no plasma, se ligando a 80% de todo zinco plasmático. É codificada pelo gene *ALB* localizado em 4q11-q13 (COSTA, 2010).

Neste trabalho, foi identificada no *spot* 30 em uma amostra de tecido tumoral. Sua expressão foi diferencial quando comparada ao linfonodo axilar metastático. Os valores de *pI* e *MM* se mostraram dentro dos parâmetros estabelecidos por Dupont (2005), indicando que a proteína se encontra no gel no local observado, os valores de *score* e o número de peptídeos sobrepostos foi satisfatório, a cobertura encontrada foi abaixo do valor tido como padrão, no entanto os outros parâmetros permite que a identificação seja tida como confiável. Para um maior esclarecimento, pode-se ser realizada novas análises no intuito de se aumentar o grau de confiabilidade.

Pode ser modificada pela fosforilação de resíduos de treonina/serina, pela glicosilação e através da ligação de dissulfeto. É encontrada sob duas isoformas produzidas por *splicing alternativo* (UniProtKB, 2013).

A vitamina D está associada com a regulação do cálcio e fosfato no metabolismo dos ossos. Pode ser obtida por meio da dieta e exposição à luz solar. No entanto, poucos alimentos possuem quantidades suficientes de vitamina D, a grande maioria (90-95%) é produzida pela pele. A forma biologicamente ativa da proteína é sintetizada nos rins (LOPES, 2012).

A proteína ligante de vitamina D (VTDB) é maior proteína transportadora de vitamina D no plasma e é codificada pelo gene *GC* localizado em 4q12-q13 (WANG *et al.*, 2013; MALIK *et al.*, 2013). Não está claro se a

diminuição nos níveis de VTDB tem algum efeito na concentração de vitamina D (WANG *et al.*, 2013).

A intervenção da vitamina D no câncer é ainda controversa. Ela é capaz de modular várias características associadas às células cancerosas por meio da inibição da proliferação celular, invasão, metástase e angiogênese (LOPES, 2012).

Estudos evidenciam a importância da vitamina D no câncer de mama, sugerindo que a diminuição a exposição à luz solar e consequentemente a vitamina D está correlacionado com a alta incidência de câncer de mama e a sua mortalidade. Em outro estudo, o baixo nível de vitamina D no plasma foi encontrado em mulheres com câncer de mama quando comparadas com mulheres sem a doença (LOPES, 2012).

Como atua na supressão do crescimento, a vitamina D tem sido alvo terapêutico. Desde então diversos estudos têm sido realizados no intuito de se investigar quais vias metabólicas e mediadores moleculares estão envolvidos na habilidade desta proteína de exercer esta função (LOPES, 2012).

A vitamina D também exerce um papel importante no desenvolvimento da glândula mamária normal por meio das vias de sinalização que controlam este desenvolvimento (LOPES, 2012).

Neste estudo a proteína vitamina-D ligante foi observada no *spot* 31 apresentando-se exclusiva no tecido tumoral, atendendo os requisitos de identificação no MALDI. Além disso, em relação aos parâmetros $\Delta MM / \Delta pI$ apresentou-se dentro dos valores estipulados.

6.2.4. Proteínas membrana-associadas com múltiplas atividades

Neste conjunto foram encontradas as proteínas: anexina (ANXA 1), proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5) e prelamina-A/C (LMNA), correspondendo a 14% do total de *spots* identificados.

As anexinas são proteínas de ligação de cálcio, que partilham um domínio que se liga a fosfolipídios e um domínio amino-terminal responsável pela especificidade da proteína (SHEN *et al.*, 2005).

A anexina 1 (ANXA1) também conhecida como lipocortina, é uma proteína codificada pelo gene *ANXA1* localizado em 9q12-q21.20 (UniProtKB, 2013). É um mediador endógeno dos efeitos anti-inflamatórios regulado por dos glicocorticoides que modula a ativação de células do sistema inato como os macrófagos (YOM *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012). Está parcialmente localizada no núcleo, indicando sua participação na sinalização intracelular (YOM *et al.*, 2011).

A função das proteínas pertencentes a esta família está associada com a regulação do metabolismo transmembrânico e adesão celular. Além disso, a anexina 1 é frequentemente associada com o controle da proliferação celular e embora não seja bem caracterizada, a baixa expressão de ANXA1 em vários tipos de câncer corrobora com esta função (SHEN *et al.*, 2005).

ANXA1 é um potencial marcador de progressão tumoral, e está superexpresso em tumores de mama, pâncreas, estômago e fígado. A baixa expressão foi observada em tumores de próstata, cabeça e pescoço e esofágicos. A perda da expressão de ANXA1 está relacionada com o desenvolvimento e progressão do câncer de mama, e a amplificação tem sido descrita como um fator de resistência às drogas (KANG *et al.*, 2012).

A ANXA 1 também está envolvida na regulação da produção de citocinas e na via de sinalização MAPK/ERK (SHEN *et al.*, 2005). Pode ser fosforilada em resíduos de serina, treonina e tirosina, e acetilada em resíduos de alanina e lisina (UniProtKB, 2013).

A expressão diferencial entre os dois tipos de tecidos foi encontrada neste trabalho, resultado da identificação proteica em um *spot* 32. Os valores de $\Delta MM/\Delta pI$ ficaram dentro dos valores estabelecidos como parâmetros, bem como os valores atribuídos aos parâmetros necessários a identificação.

A fosfoglicomutase é uma enzima de metabolismo da glicose que cataboliza a conversão de glicose-1-fosfato para glicose-6-fosfato (IKEYA *et al.*, 2012). A proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5) é codificada pelo gene *PGM5* localizado em 9q21.11, e é responsável pela adesão célula-célula e as junções célula-matriz.

Pode ser encontrada na célula sob duas isoformas com valores de MM iguais a 62,225 para a isoforma 1 e 41,790 para a isoforma 2. O valor

encontrado neste trabalho foi de 59,000, portanto, pela proximidade, acredita-se tratar da isoforma 1. Sofre fosforilação em resíduos de treonina/serina (*UniProtKB*, 2013).

Foi identificada no *spot* 33 em uma amostra de tumor no qual foi observada como exclusiva para este tipo de tecido. Os valores de *score* e percentual de cobertura, não foram suficientes para uma identificação confiável da proteína. Além disso, foi observado um desvio no valor de ΔpI , resultando na diminuição da confiabilidade da identificação, visto que o *spot* não se encontra no local esperado. Portanto, esta proteína está sujeita a novas análises para confirmação da identificação.

As laminas são proteínas de filamento intermediário que formam uma malha de proteína que reveste o interior da membrana nuclear, contribuindo na manutenção da forma e da estabilidade mecânica do núcleo, além disso, é importante na manutenção da comunicação mecânica entre o núcleo e a matriz extracelular (BERTRAND *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013).

O gene *LMNA* codifica duas importantes proteínas responsáveis pelo envoltório nuclear, as laminas A e C (lamina A/C) localizado em 1q22 (SINGH *et al.*, 2013).

A lamina A/C (*LMNA*) forma interações com vários componentes nucleares, e estão envolvidas em processos como replicação e reparo do DNA, organização da cromatina, regulação transcricional e diferenciação (ZWERGER *et al.*, 2013).

Mutações no gene *LMNA* podem resultar em doenças chamadas de laminopatias, entre elas o câncer. Estudos evidenciam a participação da lamina A na regulação nas transduções de sinal da via ERK1/2 (CHOI *et al.*, 2012; ZWERGER *et al.*, 2013).

A proteína *LMNA* possui quatro isoformas, isoforma A, isoforma C, isoforma A Δ 10 e isoforma 4 e suas respectivas MM 74.139; 65.135; 70.661 e 63.893. As modificações ao qual estão submetidas são fosforilação, acetilação, metilação, prenilação (adição de moléculas hidrofóbicas as proteínas), lipoproteína, prenilação. A maior quantidade de MPT sofrida é a fosforilação em resíduos de serina e treonina (UniprotKB, 2013).

A proteína foi identificada em um *spot* 34 no tecido tumoral no qual se apresentou como exclusiva. Os valores do *score* e do percentual de cobertura não se mostraram elevados para que o grau de confiabilidade de identificação da proteína também fosse alto. No entanto, os valores de $\Delta MM/\Delta pI$ encontraram-se dentro dos valores estabelecidos como critérios utilizados na localização da posição do *spot* no gel em relação ao esperado. Esta proteína pode então ser submetida a novas análises no intuito de se confiar a sua identificação.

6.2.5. Enzimas metabólicas

As enzimas metabólicas corresponderam a 5% do número de *spots* identificados. A proteína identificada nesta classe foi a aminocilase 1 (ACY1).

A aminoacilase 1 (ACY1) é uma enzima citosólica responsável pela hidrólise de resíduos de aminoácidos α -acilado em peptídeos N-terminal no catabolismo de proteínas intracelular. A ACY1 é codificada pelo gene *ACY1* localizado no cromossomo 3p21.1 (SHI *et al.*, 2013).

Muitas proteínas intracelulares são acetiladas no intuito de se preservar sua integridade, função e interação proteína-proteína. Entretanto, durante a degradação, estes resíduos acetilados são desacetilados para que haja a liberação dos aminoácidos que serão utilizados na síntese de novas proteínas. A aminoacilase é responsável pela desacetilação dos aminoácidos livres resultado da clivagem. Além disso, esta proteína tem sido associada com a tumorigênese em vários tipos de cânceres humanos (SHI *et al.*, 2013).

Em câncer de pulmão de células pequenas observou-se uma diminuição dos níveis dessa proteína, enquanto que a superexpressão resulta na inibição da proliferação celular e indução da apoptose. Estes dados sugerem que ACY1 atue como supressor de tumor neste tipo de câncer. No entanto, em câncer colorretal, foi observado um aumento na expressão de ACY1 quando comparado com o tecido normal (SHI *et al.*, 2013).

Neste trabalho a identificação da proteína ocorreu no *spot* 35 em amostra de tumor de primário, no qual foi mais expressa do que no tecido de

linfonodo ($p < 0,02$). Os valores de MM e pI estiveram dentro dos valores atribuídos como parâmetros, bem como os valores atribuídos ao *score* e percentual de cobertura.

6.2.6. Degradação proteica

Constituíram cerca de 5% do total de proteínas identificadas e é representada pela subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5).

Esta proteína é codificada pelo gene *PSMA5* localizado no cromossomo 1p13 (UniProtBK, 2013).

O proteossomo é um complexo de proteinase multicatalítica, que é caracterizado pela sua capacidade de clivar peptídeos com Arg, Phe, Tyr, Leu, Glu e adjacentes ao grupo que se despede com um pH neutro ou ligeiramente básico. O proteossomo tem uma atividade proteolítica dependente de ATP.

Foi encontrado no *spot* 37 em amostra de tumor apresentando-se como exclusiva neste tecido. Os parâmetros utilizados para identificação foram satisfatórios, bem como os valores de $\Delta MM/\Delta pI$.

A proteína PSA5 está sujeita a fosforilação em resíduos de serina e treonina, acetilação em resíduos de metionina e glicosilação (UniProtBK, 2013).

6.2.7. Detoxificação e proteínas redox

As enzimas de detoxificação e proteínas redox são enzimas que atuam no catabolismo celular e manutenção da homeostase celular e do organismo. Neste trabalho correspondeu a 5% do total de *spots* identificados. A proteína classificada dentro desta classe foi a glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1).

As proteínas glutathione S-transferases são proteínas de detoxificação de metabólitos carcinogênicos, catalisando o acoplamento da glutathione a uma grande variedade de compostos orgânicos, produto de estresse oxidativo, para formar produtos solúveis em água (SANGUANSIN *et al.*, 2012).

A glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1) é uma enzima metabólica pertencente a família glutathione S-transferase, e é codificada pelo gene *GSTO1* em 10q25.1. É ubiquitariamente expressa. Possui alta expressão em tecidos de fígado, pâncreas, músculo esquelético, baço, timos, cólon, leucócitos e coração, e baixa expressão em cérebro e pulmão (*UniprotKB*, 2013).

A proteína GSTO1 apresentou-se como exclusiva para o tecido tumoral quando comparada com o tecido de linfonodo axilar metastático no *spot* 38. Os critérios utilizados para a identificação foram atendidos, bem como os parâmetros estabelecidos por Dupont.

Apresenta três isoformas, 1, 2 e 3 com MM iguais a 27.566, 23.709 e 24.796. O valor encontrado neste estudo foi 31.000 e por proximidade, supõem-se tratar da isoforma 1. Pode ser acetilada em resíduos de lisina.

6.2.8. Chaperonas moleculares

As chaperonas moleculares são proteínas que medeiam o desenovelamento e o enovelamento de proteínas, na forma ou nas posições corretas, prevenindo a célula contra o acúmulo de proteínas deformadas (AUDOUARD *et al.*, 2011).

As chaperonas utilizam da quebra da molécula de ATP para o remodelamento de proteínas. Podem se associar a macromoléculas, evitando ligações com proteínas que ainda não estejam corretamente enoveladas. Esta capacidade de interação a outras proteínas permite que atuem como reparadoras, modificando a conformação, reparando ou degradando proteínas deformadas ou danificadas, corregulando a homeostase e o ciclo celular (MINAFRA *et al.*, 2006).

Esta classe correspondeu a 3% do total de *spots* identificados neste trabalho. A proteína aqui classificada foi a endoplasmína (ENPL) encontrada no *spot* 40 diferencialmente expressa em linfonodo quando comparada com tecido tumoral ($p < 0,05$). Apresentou o valor de ΔpI dentro dos parâmetros, no entanto o valor de ΔMM ultrapassou o limite de 20% estabelecido por Dupont. O valor do *score* foi satisfatório o que valida o valor de cobertura que foi baixo.

A endoplasmina é uma chaperona molecular e participa no processamento e transporte de proteínas secretadas. É também denominada como HSP90B1, Grp94 e Gp96. É codificada pelo gene *HSP90B1* e está localizado no cromossomo 12q24.2-q24.3. A endoplasmina é encontrada no retículo endoplasmático, onde proteínas são traduzidas. Se proteínas deformadas acumulam no retículo endoplasmático, há uma indução de estresse desta organela que resulta na indução da expressão de genes de chaperonas, incluindo a endoplasmina (AUDOUARD *et al.*, 2011).

Em células normais, os níveis de endoplasmina correspondem de 1-2% do total de proteínas presentes. No entanto, em células sob estresse, há uma elevação dos níveis proteicos. Nas células cancerosas este pode chegar a 3-5% do total de proteínas encontradas. Pela inibição da apoptose, os elevados níveis de endoplasmina pode levar no aumento da proliferação celular, resultando na sobrevivência e crescimento destas células (LI *et al.*, 2012).

A endoplasmina está envolvida com a via de sinalização Akt e do receptor de glicocorticoide. Através destas interações há um aumento no metabolismo da glicose, proliferação celular, migração e diminuição da apoptose. Em melanoma, foi encontrado um aumento nos níveis de expressão em metástases quando comparados com o tumor primário. Este aumento também foi observado em pacientes com leucemia linfocítica aguda e com câncer de mama (CAWTHORN *et al.*, 2012), corroborando os dados encontrados neste trabalho, visto que foi observado uma expressão diferencial entre o tumor primário e o linfonodo axilar metastático, havendo uma maior expressão no tecido metastático ($p < 0,05$).

6.3. Classificação funcional ($p < 0,02$)

Nesta análise as proteínas foram classificadas em 6 classes: citoesqueleto e proteínas associadas (29%), crescimento celular e reguladores de proliferação (14%), proteínas com funções de ligação / transporte (14%), enzimas metabólicas (7%), degradação proteica (7%), proteínas com outras funções (29%).

6.3.1. Citoesqueleto e proteínas associadas

Os microtúbulos são polímeros que estão envolvidos na mitose, transporte intracelular, morfologia assimétrica dos neurônios, motilidade flagelar e ciliar. As proteínas beta tubulinas são os maiores constituintes dos microtúbulos (LEANDRO-GARCÍA, 2010).

Nesta análise foram identificados três tipos de tubulinas: a cadeia beta da tubulina (TBB5), a cadeia beta-4A da tubulina (TBB4A) e cadeia beta-4B da tubulina (TBB4B) em um mesmo *spot* (12) com um razoável número de *score* e número de peptídeos sobrepostos, no entanto com baixo percentual de cobertura, no entanto, os dois primeiros parâmetros garantem a identificação, mas para uma maior confiabilidade estas proteínas podem ser submetidas a uma nova análise. As proteínas TBB5 e TBB4A apresentaram valores de $\Delta MM/\Delta pI$ dentro dos parâmetros estipulados, apenas TBB4B apresentou o valor de ΔpI fora destes parâmetros. Esta proteína está sujeita a fosforilação em resíduos de serina e tirosina e acetilação em resíduos de lisina, ambas as modificações podem resultar em alteração do valor de *pI*, o que leva a uma mudança na localização do *spot* no gel.

As tubulinas estão localizadas no citoplasma, citoesqueleto e microtúbulos, a cadeia beta tubulina (TBB5) é codificada pelo gene *TUBB* localizado em 6p21.33, a cadeia beta-4A da tubulina (TBB4A) é codificado pelo gene *TUBB4A* localizado em 19p13.3, e a cadeia beta-4B da tubulina (TBB4B) é codificado pelo gene *TUBB4B* localizado em 9q34 (UniProtKB, 2013).

6.3.2. Crescimento celular e reguladores de proliferação

A proteína triptofano-tRNA ligase (SYWC) catalisa a ligação do triptofano ao tRNA^{trp} durante a biossíntese de proteína, podendo ser utilizado como marcador em tecidos cancerosos (PALEY, 2011). É codificado pelo gene *WARS* localizado em 14q32.31.

É membro da família das proteínas aminoacil-tRNA-sintetase, que são enzimas responsáveis pela ligação covalente do aminoácido a porção 3' do seu

respectivo tRNA. Estas proteínas são importantes, pois erros na tradução resultam em proteínas não funcionais que podem resultar na morte celular ou diversas doenças, entre elas o câncer (SHEN *et al.*, 2006).

A reação de aminoacilação ocorre em duas etapas: na primeira, o aminoácido por hidrólise de ATP origina uma forma aminoacil-AMP, após isso, esta é transferida a porção 3' do tRNA formando o aminoacil-tRNA (SHEN *et al.*, 2006; PALEY, 2011).

A baixa expressão de SYWC está correlacionada com um prognóstico desfavorável e sobrevida em pacientes com câncer colorretal. Em células de câncer pancreático, a alta expressão está relacionada com altas taxas de crescimento e aumento da habilidade de metastatização, enquanto que a hipóxia está relacionada com baixos níveis desta proteína neste tipo de câncer (PALEY, 2011).

A expressão de SYWC é induzida nas células do fígado durante o processo de hepatite B e superexpressa pela proteína K15 no sarcoma de Kaposi associado à herpevírus (PALEY, 2011).

A presença desta proteína foi observada no *spot* 26 em uma amostra de linfonodo axilar metastático, com expressão diferencial quando comparada ao tumor primário ($p < 0,01$). No entanto, os valores de *score* e número de peptídeos sobrepostos foram satisfatórios, o que permitiu validar o valor do percentual de cobertura que neste caso foi baixo. Os valores de $\Delta MM/\Delta pl$ estavam condizentes com os parâmetros utilizados, indicando que o *spot* estava no local esperado.

O triptofano-tRNA ligase é encontrado no citoplasma e está presente sob duas isoformas resultado de um *splicing* alternativo. A isoforma 2 tem atividade angiostática, ao contrário da isoforma 1. É correlacionada por ativar as vias de sinalização ERK, Akt e NOS envolvidas na angiogênese, reorganização do citoesqueleto e expressão de genes associados a resposta induzida pelo estresse (UniProtKB, 2013). Os valores de MM para as isoformas são 53.165 e 48.180 respectivamente. O valor encontrado para esta proteína neste trabalho foi 61.000 e por proximidade acredita-se tratar da isoforma 1.

6.3.3. Proteínas com funções de ligação / transporte

A proteína ligante de selênio 1 (SBP1) é uma proteína responsável pelo transporte de selênio e é codificada pelo gene *SELENBP1* localizado em 1q21–22. É expressa em diversos tecidos incluindo coração, pulmão, rins e tecidos do trato digestivo. Sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que pode estar relacionada com o transporte dentro do complexo de Golgi, a expressão é significativamente diminuída em uma variedade de cânceres epiteliais como próstata, pulmão, ovário, estômago e cólon (FANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

O selênio é importante, com propriedades antioxidantes e antitumorais. Em um estudo dirigido de Lee e colaboradores (2005) foi observado que o selênio é capaz de interromper a sinalização de receptores de estrogênio em células de câncer de mama *in vitro*. Os estrogênios exercem seu efeito proliferativo estimulando a progressão do ciclo celular e protegendo-as contra a morte celular. Em presença de selênio, há uma interrupção do crescimento e estimulação da apoptose, em parte pela ruptura da sinalização do estrogênio (MILIOLI, 2011).

Foi identificada no *spot* 28 de uma amostra diferencialmente expressa de linfonodo ($p < 0,001$). Os valores de *score*, percentual de cobertura e o número de peptídeos sobrepostos mostraram-se satisfatórios, bem como os valores encontrados de $\Delta MM/\Delta pl$.

É encontrada no citoplasma, núcleo e membranas. Está presente na célula sob três isoformas resultados do *splicing* alternativo. Pode ser modificada pela fosforilação em resíduos de serina (UniProtKB, 2013).

As transferrinas são proteínas responsáveis pelo transporte de íons de ferro de importância nos processos celulares. No entanto, quando estão livres, são altamente tóxicos, devido à formação de radicais livres que resultam em danos as proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (MOHD-PADIL *et al.*, 2013). A serotransferina (TRFE) é uma proteína codificada pelo gene *TF* e está localizada em 3q22.1, compreende uma das proteínas pertencentes a família das transferinas (UniProtBK, 2013).

Alguns estudos apresentam indicações de que esta proteína também esteja envolvida em atividades de crescimento e diferenciação celular. Por esse motivo a sorotransferrina e seus receptores têm sido usados como alvo na intervenção farmacêutica, principalmente para o diagnóstico na inflamação e terapia em câncer (COSTA, 2010).

Foi identificada no *spot* 29, onde se apresentou diferencialmente expressa em uma amostra de linfonodo ($p < 0,001$). Os valores obtidos se enquadraram nos parâmetros necessários a identificação confiável desta proteína. No entanto, os valores apresentados por $\Delta MM/\Delta pI$ foram acima daqueles estipulados. Portanto, o *spot* não estava localizado na posição esperada.

Esta proteína pode sofrer MPT o que modificaria o seus valores de MM e de pI, explicando o motivo pelo qual não foi possível a observação da localização no gel deste *spot*. As modificações podem ser a metilação em resíduos de arginina, a glicosilação e ligação de dissulfeto (*UniProtKB*, 2013).

6.3.4. Enzimas metabólicas

A isomerase Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA (ECH1) é uma enzima auxiliar que participa da degradação de ácidos graxos insaturados. Ela catalisa a isomerização do 3,5-dienoil-CoA para 2,4-dienoil-CoA que é necessária para esta degradação (ZHANG *et al.*, 2001).

É codificada pelo gene *ECH1* localizado em 19q13.1.

A superexpressão de ECH1 pode aumentar a geração de energia, nas mitocôndrias, promovendo a migração de células cancerosas para células metastáticas. Em pacientes com carcinoma gástrico e presença de linfonodos metastáticos, foi observado um aumento nos níveis de expressão de ECH1 (LIU *et al.*, 2012). Neste estudo foi observada uma expressão diferencial entre o tumor primário e o linfonodo, havendo uma maior expressão desta proteína no tecido metastático ($p < 0,02$). A diminuição dos níveis de ECH1 pode inibir a proliferação, diminuindo a capacidade de migração destas células (LIU *et al.*, 2012).

O valor de *score* e número de peptídeos sobrepostos foram satisfatórios para permitir uma boa identificação, o que validou o valor do percentual de cobertura. O valor de ΔpI desviou do estipulado pelos parâmetros de Dupont, indicando que não houve correspondência com a localização observada e esperada.

Esta proteína sofre a ação da acetilação nos resíduos de lisina, o que explica este desvio em *pI*, visto que esta MPT pode resultar em uma mudança nos valores deste parâmetro.

6.3.5. Degradação proteica

As peroxirredoxinas são enzimas que realizam funções importantes no catabolismo celular e proteção contra estresses metabólicos (MINAFRA *et al.*, 2006).

A peroxirredoxina-4 (PRDX4) é uma proteína antioxidante pertencente a família das peroxirredoxinas. Está localizada no retículo endoplasmático e espaço extracelular, com alta expressão no pâncreas, fígado e coração, e baixa expressão nos leucócitos e cérebro. Esta enzima reduz o estress oxidativo através da redução de peróxido de hidrogênio em água em uma reação dependente de tiol (SCHULTE, 2011).

A PRDX4 é responsável não somente pela manutenção dos níveis das espécies reativas de oxigênio (ERO), em especial os peróxidos, como o peróxido de hidrogênio, como também pela reativação de fosfatases oxidadas (PALANDE *et al.*, 2011), influenciando as vias de sinalização que são sensíveis ao estado redox da célula (KIM *et al.*, 2012).

É codificada pelo gene *PRDX4* localizado em Xp22.11 (UniProtBK, 2013).

Muitos estudos têm demonstrado mudanças na expressão de PRDX4 ou de sua forma reativa em diversas doenças como câncer e diabetes (SCHULTE, 2011). Embora a expressão de PRDX4 tenha sido detectada em diversos tipos de câncer, seu envolvimento na carcinogênese ainda não está bem estabelecido (KIM *et al.*, 2012).

Mutações em genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogenes em oncogenes podem elevar os níveis de ROS dentro da célula, e resultando em aumento na expressão de proteínas antioxidantes, entre elas a PRDX4. A alta elevação de ROS resulta na senescência celular e apoptose, e no aumento da expressão de PRDX4, no entanto, a superexpressão desta proteína antioxidante estimula o crescimento celular bem como de outras características associadas a células cancerosas (KIM *et al.*, 2012).

As espécies reativas de oxigênio são importantes, pois participam de processos vitais na célula como a estimulação do crescimento celular e processo inflamatório, por meio da regulação de diversas cascatas de sinalização. A desregulação das vias de EROs está associada com muitas doenças humanas, dentre elas o câncer. A acumulação excessiva de radicais livres tem sido encontrada nos cânceres humanos e sabe-se que estão envolvidos no processo oncogênico através de mecanismos genéticos e epigenéticos. A primeira mutação ocorrida em um gene supressor ou um proto-oncogene ativado em oncogene resulta no aumento dos níveis de EROs que em contrapartida promove a instabilidade genética nesta célula e o acúmulo de novas mutações (KIM *et al.*, 2012).

A identificação proteica foi realizada no *spot* 39 onde se mostrou mais expressa no linfonodo do que no tumor ($p < 0,01$). Os valores para identificação mostraram satisfatórios bem como os valores de $\Delta MM/\Delta pl$, indicando uma maior confiabilidade na identificação desta proteína.

6.3.6. Proteínas com outras funções

Constituíram 12% do total de proteínas identificadas. As proteínas pertencentes a este grupo foram: cadeia leve da ferritina (FRIL), proteína heme-ligante 2 (HEBP2), proteína SOGA1 (SOGA1) e proteína homóloga slowmo 2 (SLMO2).

A ferritina é uma proteína responsável pelo armazenamento e metabolismo do ferro. É codificada pelo gene *FTL* localizado em 19q13.33 (UniProtBK, 2013).

Foi observado que há um aumento da expressão de ferritina em vários tipos de câncer. No de mama, dados sugerem que o aumento está correlacionado com o estágio da doença, e que pode estar associado com o processo de metástase (ALKHATEEB *et al.*, 2013).

Em um estudo, com o objetivo de se comprovar a correlação, no câncer de mama, entre grau histológico e estágio da doença com a expressão de ferritina, exames histológicos foram realizados. Na mama benigna a distribuição de ferritina apresentou fraca coloração nas células ductais deste tecido, enquanto que em tecidos cancerosos a coloração foi moderada, e forte coloração dentro do estroma tumoral (ALKHATEEB *et al.*, 2013).

Neste estudo, a ferritina apresentou-se diferencialmente expressa nos tecidos do tumor primário e linfonodo no *spot* 41. No tumor houve uma maior expressão dessa proteína ($p < 0,001$). Os critérios para identificação foram atendidos bem como os valores de $\Delta MM/\Delta pl$ indicando que os *spots* estavam localizados em suas posições esperadas.

A proteína heme-ligante 2 (HEBP2) é codificada pelo gene *HEBP2* localizado em 6q24 e pode promover a transição de permeabilidade mitocondrial e além de facilitar a morte celular por necrose sob diferentes condições de estresse. É encontrada nas mitocôndrias e no citoplasma (*UniProtKB*, 2013).

Apresentou-se, neste trabalho, diferencialmente expressa entre os dois tecidos estudados no *spot* 42, apresentando uma maior expressão no linfonodo ($p < 0,001$). Os critérios utilizados para identificação foram satisfatórios, bem como o valor de Δpl , no entanto, o valor obtido por ΔMM foi superior a 20%. De acordo com o *UniProtKB*, esta proteína apresenta duas isoformas, resultado do splicing alternativo, com valores teóricos de MM de 22,875 para a isoformas 1, e de 20,859 para a isoformas 2. O valor observado de MM para esta proteína foi de 31,000, supondo-se então tratar-se da isoforma 1 por apresentar um valor mais próximo àquele encontrado. No entanto, de acordo com este mesmo banco de dados, a proteína sofre modificação pós-traducional, fosforilação, o que poderia explicar essa diferença encontrada entre os valores observados e teóricos.

A proteína SOGA1 (SOGA1) está envolvida na regulação da autofagia, e é codificada pelo gene SOGA1 localizado em 20q11.23.

Foi identificada no *spot* 43 em uma amostra de tecido tumoral. Apresentou-se diferencialmente expressa quando comparada com o tecido de linfonodo, 4,889 ($p < 0,01$). Os critérios de identificação não foram satisfatórios, pois apresentaram valores muito baixos quanto ao *score*, percentual de cobertura e número de peptídeos sobrepostos. A variação entre os valores de MM teórico e observado foi superior a 20%, o valor de Δpl foi satisfatório, no entanto não foi suficiente para garantir a identificação da proteína, portanto esta proteína é indicada a ser submetida a novas análises no intuito de se comprovar a sua identificação.

A SOGA1, por *splicing* alternativo apresenta 4 isoformas, a isoformas 1 apresenta valor de MM de 159.760, a isoformas 2 de 183,858, a isoformas 3 de 55.761 e a isoformas 4 de 115.827. O valor observado para esta proteína foi de 48.000 indicando tratar-se da isoformas 3. Em adição, SOGA1 sofre fosforilação em resíduo de serina, o que pode resultar em alteração nos valores de MM observados. O valor de Δpl está de acordo com os parâmetros atribuídos a ele.

A proteína homóloga slowmo 2 (SLMO2) é codificada pelo gene *SLMO2* localizado em 20q13.32. Possui duas isoformas, resultado de *splicing* alternativo. A isoformas 1 apresenta MM de 21.495 e a isoformas 2 de 18.167.

Neste estudo apresentou-se diferencialmente expressa no tecido tumoral, *spot* 44, tendo uma maior expressão neste ($p < 0,01$). Os valores apresentados para a identificação foram satisfatórios, no entanto, os valores de $\Delta MM/\Delta pl$ diferiram dos padrões.

6.4. Análises comparativas

As identificações obtidas neste trabalho forneceram informações adicionais e relevantes no estudo comparativo entre tumor primário e linfonodo metastático axilar, na tentativa de uma melhor caracterização entre os dois

tecidos buscando um maior entendimento da ação de proteínas envolvidas nos processos de carcinogênese e metástase.

Nesta análise foram encontradas 21 diferentes proteínas, destas, 18 proteínas eram de tumor primário e identificadas em 25 *spots* e cinco no linfonodo axilar metastático identificados em seis *spots*, duas proteínas (*heat shock* e vimentina) foram encontradas nos dois tipos de tecidos (Apêndice 3).

Dos *spots* identificados no tumor primário, 16 foram encontrados expressos apenas neste tecido e nove mostraram-se diferencialmente expressos, enquanto que no linfonodo axilar três *spots* foram identificados expressos somente neste tecido e três com expressão aumentada (Apêndice 4 e Apêndice 5).

Nas proteínas HSPB1, VIME e PHB, foi observada uma variação na expressão proteica entre os *spots* identificados, alguns apresentaram expressão exclusiva em um tecido enquanto outros *spots* mostraram-se diferencialmente expressos entre os tecidos. O programa de análise avalia os pacientes individualmente, os tecidos (tumor primário e linfonodo axilar metastático) foram pareados e comparados quantitativamente, segundo a variação na expressão proteica, e qualitativamente, segundo a presença/ausência de um *spot*. Em alguns casos, o *spot* analisado não é detectado, pelo programa, em todos os géis, seja pela ausência ou por seu tamanho, fazendo com que em alguns sejam tidos como exclusivos em um determinado tecido, e em outros como diferencialmente expressos. Além disso, há uma heterogeneidade tumoral que faz com que diferentes pacientes tenham conjuntos de proteínas distintas, em função do grau e estágio que se encontram.

Nos cinco *spots* identificados, na HSPB1, três foram encontrados em amostra de tumor, sendo que destes, um apresentou variação na expressão proteica entre o tumor e linfonodo, e dois identificados no linfonodo e, expressos exclusivamente neste tecido.

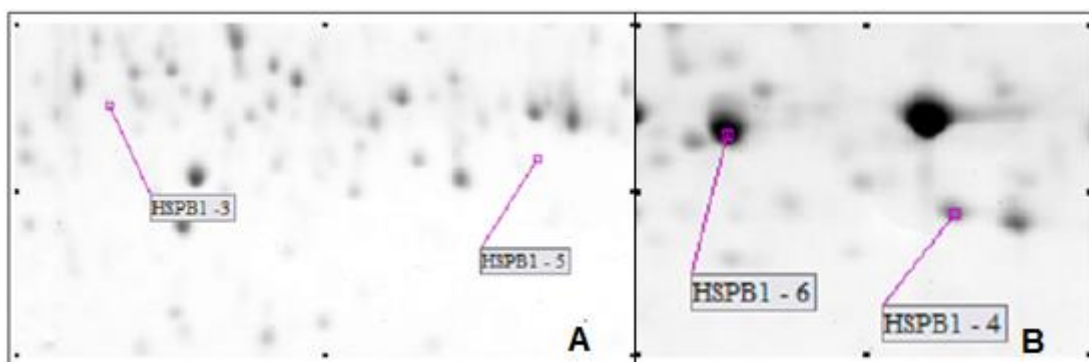


FIGURA 7 - Variação da expressão de *heat shock beta-1* (HSPB1). Géis de referência CP 645T (A) e CP 645L (B).

FONTE: O autor, 2013.

Na VIME, seis *spots* foram identificados, cinco exclusivos do tumor primário e um no linfonodo, que se mostrou diferencialmente expresso.

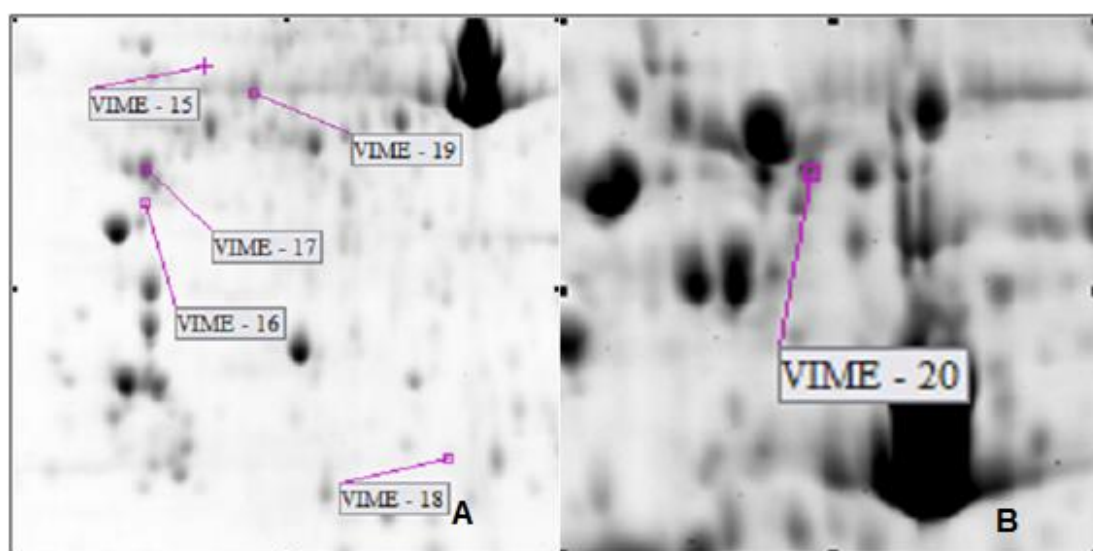


FIGURA 8 - Variação da expressão de vimetina (VIME). Géis de referência CP 645T (A) e CP 645L (B).

FONTE: O autor, 2013.

A PHB foi encontrada em dois *spots* apenas em tecido tumoral, um diferencialmente expresso e outro foi identificado apenas no tumor.

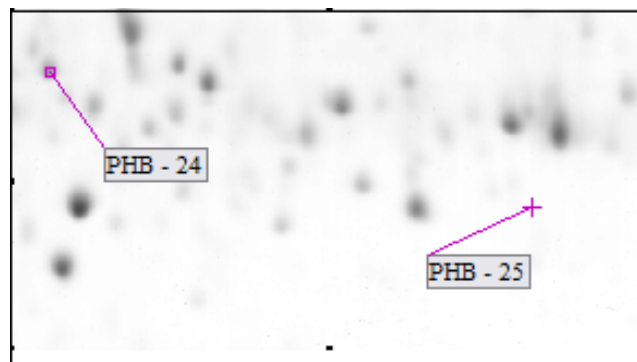


FIGURA 9 - Variação na expressão de proibitina (PHB). Géis de referência CP 645T (A) e CP 645L (B).
 FONTE: O autor, 2013.

Devido ao reduzido número de amostras e de *spots* com identificação positiva, não foi possível a identificação de proteínas que fossem utilizadas como marcador de doença metastática. No entanto, observações importantes podem ser feitas a respeito dos resultados obtidos.

Ao contrário de Milioli (2011) os resultados aqui obtidos não mostraram grande número de proteínas e *spots* com identificação positiva. A alta concentração proteica encontrada no trabalho anterior pode explicar esta variação. Além disso, a maioria dos *spots* analisados neste trabalho tinha tamanho reduzido, e não foi encontrado em todos os géis, resultando em uma diminuição na concentração de proteínas e assim em um menor número de identificações positivas. A utilização de géis preparados previamente pode ter contribuído para este resultado, já que, as proteínas fixadas nos géis podem perder suas concentrações dificultando uma boa identificação.

A presença de um *spot* em mais géis também pode explicar os resultados aqui encontrados, isto porque esta diferença pode alterar o nível de significância em função do grau de liberdade que é calculado pelo número de um determinado *spot* subtraído por 2, ou seja, se ele está presente em dois géis o grau de liberdade pode ser diferente caso ele esteja presente em três géis, o que modifica o nível de significância. Assim, a presença de *spots* em todos os géis pode ter permitido uma maior identificação no trabalho de Milioli (2011).

Ainda comparando ambos os trabalhos, foi observada a presença de proteínas semelhantes como a VIME, ACTB/G, HSPB1, K1C19 e K2C7. A

paridade destas identificações pode ser explicada pela presença de diferentes isoformas decorrente da ocorrência de *splicing alternativo*, por modificações pós-traducionais as quais as proteínas podem estar submetidas que resultam na mudança nos valores MM e pI, numa localização diferente no gel. O inverso também foi observado, algumas proteínas foram exclusivas deste trabalho como a TCTP, DISC, PHB, ALBU, VTDB, PGM5, LMNA, ACY1, PSA5, GSTO1 e ENPL.

Em comparação com o trabalho de Costa (2010) as proteínas ACTB/G, GDIR1, VIME, ALBU, VTDB, ANXA1 e ENPL foram encontradas nos dois trabalhos. Proteínas como a *heat shock*, citoqueratina e a 14-3-3 foram observadas nos dois trabalhos, mas em tipos diferentes. A proteína *heat shock* encontrada no primeiro trabalho (2010) foi a beta-6 e neste trabalho a beta-1. A citoqueratina foi tipo I-17 e neste trabalho a tipo I-19, e as isoformas encontradas no trabalho anterior foram 14-3-3 gama, alfa e beta e neste a zeta. As demais proteínas foram exclusivas para este trabalho.

O trabalho realizado por Costa (2010) visou à caracterização de proteínas em tecido não tumoral, no entanto, algumas proteínas identificadas neste trabalho são apontadas na literatura como diferencialmente expressas em relação aos tumores mamários, o que pode explicar a semelhança em relação entre o trabalho de Costa e este. Além disso, algumas proteínas como ACTB/G, GDIR1, ALBU, VTDB estão inseridas na classe composta por proteínas do citoesqueleto, sendo normalmente expressas tanto em células não tumorais como em tumorais, pois participam da estrutura e organização de ambos tipos celulares.

Em comparação com o trabalho de Minafra e colaboradores (2006) foram encontradas seis proteínas semelhantes, ACTB/G, VIME, 1433Z, PHB, ANXA1. As demais foram exclusivas para este trabalho. No entanto, algumas diferenças podem ser observadas quanto à metodologia. A presença de proteínas exclusivas em cada trabalho é em parte explicada pelo tipo de tira utilizada em cada experimento. Minafra e colaboradores utilizaram tiras de 18cm com pH que variou entre 3,5 e 10, enquanto que neste estudo foram utilizadas tiras de 13cm com gradiente de pH de 4-7, para associar com os trabalhos realizados previamente no laboratório.

Na segunda análise realizada nos *spots* com nível de significância abaixo de 0,02, que não foram identificados ou tiveram identificação duvidosa no trabalho de Milioli (2011), foram identificadas nove diferentes proteínas que não estavam inseridas no quadro de proteínas encontradas, TBB5, TBB4B, TBB4A, PHB, SYWC, ECH1, HEBP2, SOGA1 e SLMO2; cinco proteínas identificadas foram semelhantes nos dois estudos, SBP1, TRFE, PRDX4, FRIL e VIME. A proibitina foi encontrada em *spots* com nível de significância abaixo e acima de 0,02 (Tabela 7 – apêndice 4).

Algumas proteínas divergiram quanto à identificação nos dois trabalhos. O *spot* 14 foi identificado neste trabalho como sendo VIME, com *score* (70) e percentual de cobertura satisfatórios (23%), e valores de $\Delta MM/\Delta pI$ dentro dos parâmetros utilizados. No entanto, o mesmo *spot* foi identificado por Milioli, como sendo K2C1, e neste caso o *score* e o percentual de cobertura foram satisfatórios. Ainda contrário às descobertas Milioli o *spot* 29 identificado como sendo K2C1. Neste trabalho refere-se à TRFE. Em ambos os casos os critérios utilizados para identificação foram satisfatórios.

Para estes casos são necessárias novas análises para a corroboração da real identidade das proteínas identificadas. Isto pode ser feito utilizando-se análise com MS/MS, no qual é escolhido um dos picos obtidos no MALDI, e este submetido à fragmentação para uma melhor identificação. Outra possibilidade é o sequenciamento destas proteínas.

Além disso, no intuito de aumentar a confiabilidade da identificação das proteínas, foram retirados *spots* aleatórios previamente identificados no trabalho de Milioli (2011), do qual se obtiveram duas identificações positivas, o *spot* 39 como PRDX4, e o *spot* 41 como sendo FRIL. Em ambos os trabalhos foram encontradas as mesmas proteínas.

Em comparação com o trabalho de Costa (2010) foram encontradas três proteínas semelhantes, TBB5, VIME e TRFE, todas associadas com citoesqueleto.

A grande maioria das proteínas encontradas nos trabalhos de Milioli (2011) e neste, pertenceu às classes de proteínas do citoesqueleto, crescimento e proliferação sendo que o maior número de *spots* encontrados foi de vimentina (20 *spots*), estando presente em sua maioria no tumor primário.

Neste estudo a maioria das proteínas com maior expressão nos tumores está associada com o citoesqueleto, crescimento celular e reguladores de proliferação. Dentre as proteínas encontradas associadas ao citoesqueleto a vimentina e citoqueratinas exercem papéis fundamentais na progressão tumoral. A vimentina é um marcador de células mesenquimais, e o aumento na expressão deste marcador está associado com o processo de transição epitelial-mesenquimal. A TEM é caracterizada pela diminuição na expressão de proteínas associadas às células epiteliais como as queratinas de citoesqueleto (8, 18, 19, E-caderina e claudinas) e aumento na expressão de marcadores de células mesenquimais como vimentina e N-caderina. Esta mudança no perfil de expressão resulta no aumento da motilidade, na perda da adesão e polaridade celular, e na aquisição de propriedades invasivas (MARKIEWICZ *et al.*, 2012). O grande número de *spots* de vimentina encontrados neste trabalho corrobora com os dados apresentados na literatura e que estão associadas com metástase (DAVE *et al.*, 2012).

As citoqueratinas, por sua vez, estão associadas com o controle da forma e propriedades mecânicas da célula. Além disso, são capazes de interagir com diversas quinases modulando as vias de sinalização associadas a ela. Por isso, durante a progressão tumoral há uma diminuição na expressão destas proteínas, o que permite que as células cancerosas adquiram a capacidade de invadir tecidos adjacentes, visto que a expressão basal destas proteínas restringe a motilidade celular (VERGARA *et al.*, 2013).

Entre as proteínas identificadas, ACTB/G e VIME, estão associadas diretamente com as modificações na adesão celular, morfologia e citoesqueleto. Outra proteína identificada e que está associada com a regulação das actinas é a ANXA1. Diversos estudos têm indicado que esta pode ser um importante mediador dos processos que resultam na TEM, além de participar dos eventos que culminam no desenvolvimento do tumor, metástase e resistência a drogas, o que faz dela um importante alvo terapêutico (VERGARA *et al.*, 2013).

Neste trabalho, ao total foram identificados 44 *spots* e 33 proteínas distintas (Apêndice 2), resultando em nove classes funcionais. A grande

maioria, 46% de proteínas estão associadas a funções do citoesqueleto, crescimento e proliferação.

Nas duas análises foram encontradas 33 diferentes proteínas em um intervalo de $0,001 < p < 0,05$. No entanto, a ampliação do número de amostras faz-se necessária bem como a aplicação de outras metodologias que resultarão em dados mais significativos.

As proteínas diferencialmente expressas identificadas nesta análise proteômica comparativa em tumores primários e linfonodos axilar metastático, em sua maioria estão associadas com progressão tumoral. A grande maioria está diretamente ligada com o citoesqueleto, crescimento e proliferação celular, o que indica que podem atuar de forma ativa nos processos que resultam em metástase.

A caracterização das proteínas no câncer de mama é dificultada pela heterogeneidade e complexidade observada nas diversas doenças que o compõem, no entanto diversos avanços foram realizados no diagnóstico e tratamento. Para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese, é necessária a identificação de marcadores que possam possibilitar um diagnóstico cada vez mais precoce. Para tal, a união dos dados gerados pela genômica, transcriptômica e proteômica pode contribuir para a descoberta de eventos iniciais da tumorigênese, bem como o esclarecimento dos diversos mecanismos que compõe a progressão tumoral.

O entendimento das vias metabólicas, das cascatas de sinalização e das interações entre as proteínas podem resultar em uma melhor caracterização do câncer de mama. Este estudo, portanto, acrescenta informações relevante, complementando as pesquisas realizadas no LabCHO. Os resultados serão acrescentados ao banco de dados existente neste laboratório ampliando os resultados obtidos nos estudos com tecido mamário não tumoral da mama adjacente e contralateral, tumoral e com linfonodo axilar metastático.

7. CONCLUSÃO

Metástase em locais distantes do tumor primário é a maior causa de morte associada a câncer. O estabelecimento e crescimento de metástase é considerado como o resultado da ativação de diversas vias de sinalização, promovido pelas mudanças ocorridas na expressão de genes importantes e sua associação com as diversas proteínas circulantes. Metástase em linfonodos ainda é o fator mais poderoso de prognóstico para recidiva e morte.

A proteômica hoje é uma ferramenta bastante importante na busca por biomarcadores associados ao câncer, neste caso, o câncer de mama. O tecido mamário, no entanto, é bastante complexo e sofre diversas mudanças ao longo da vida, o que dificulta estabelecer um perfil proteômico. Neste trabalho foram identificadas diversas proteínas, não presentes nos trabalhos anteriores, bem como isoformas que possam evidenciar possíveis modificações pós-traducionais assim como a ocorrência de *splicing* alternativo, responsáveis pelas variações aqui encontradas. Muitas das proteínas aqui identificadas estão associadas com progressão tumoral que culmina na metástase, além de participarem como reguladores de diversas vias de sinalização importantes para a célula.

Os dados obtidos neste trabalho somados àqueles descritos em trabalhos anteriores do grupo poderão fornecer informações relevantes ao processo de progressão tumoral. Estudos utilizando a abordagem proteômica e comparando o tumor primário e o respectivo linfonodo metastático são raros na literatura, tornando nossas informações relevantes para o entendimento do processo de progressão e metástase.

8. REFERÊNCIAS

ABDELNUR, P.V. **IMAGEAMENTO QUÍMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS UTILIZANDO MALDI (MALDI IMAGING MASS SPECTROMETRY) APLICADO A TECIDOS VEGETAIS**. EMBRAPA: CIRCULAR TÉCNICA, v.6, 2008.

ACHARYYA, S.; OSKARSSON, T.; VANHARANTA, S.; MALLADI, S.; KIM, J.; MORRIS, P. G.; MANOVA-TODOROVA, K.; LEVERSHA, M.; HOGG, N.; SESHAN, V.E.; NORTON, L.; BROGI, E.; MASSAGUE, J. **A CXCL1 PARACRINE NETWORK LINKS CANCER CHEMORESISTANCE AND METASTASIS**. CELL, v. 150, p. 165-178, 2012.

ALBERTS, B. **BIOLOGIA MOLECULAR DA CÉLULA**. 4º ED. PORTO ALEGRE: ARTMED, 2004.

ALITALO, A; DETMAR, M. **INTERACTION OF TUMOR CELLS AND LYMPHATIC VESSELS IN CANCER PROGRESSION**. ONCOGENE, v.31, p. 4499-4508, 2012.

ALKHATEEB, A.A.; HAN, B.; CONNOR, J.R. **FERRITIN STIMULATES BREAST CANCER CELLS THROUGH AN IRON-INDEPENDENT MECHANISM AND IS LOCALIZED WITHIN TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES**. BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT , v. 137, p. 733–744 , 2013.

AMENDOLA, L.C.B.; VIEIRA, R.A. **A CONTRIBUIÇÃO DOS GENES BCRA NA PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA**. REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). DISPONÍVEL EM <[HTTP://WWW.CANCERSTAGING.ORG/](http://www.cancerstaging.org/)> ACESSADO EM DEZEMBRO DE 2012.

APTE, U.M.; MEHENDALE H.M. **PROTEOMICS**. ENCYCLOPEDIA OF TOXICOLOGY, 2^o ED, P. 551, 2005.

AUDOUARD, C.; LE MASSON, F.; CHARRY, C.; LI, Z.; CHRISTIANS, E.S. **OOCYTE-TARGETED DELETION REVEALS THAT HSP90B1 IS NEEDED FOR THE COMPLETION OF FIRST MITOSIS IN MOUSE ZYGOTES**. PLoS ONE, v. 6, 2011.

BATISTI, C.; AMBROSIO, M.R.; ROCCA, B.J.; TOSI, G.M.; SANCHEZ, J.C.; ARCURI, F.; CINTORINO, M.; TRIPODI, S.A. **TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOUR PROTEIN (TCTP) IS PRESENT IN HUMAN CORNEA AND INCREASES IN HERPETIC KERATITIS**. DIAGNOSTIC PATHOLOGY, v. 7, 2012.

BANFALVI, G. **METASTATIC VIEW OF BREAST CANCER**. CANCER AND METASTASIS REVIEWS, v. 31, P. 815-22, 2012.

BASKIN, Y.; YIĞITBAŞI, T. **CLINICAL PROTEOMICS OF BREAST CANCER**. CURRENT GENOMICS. v. 11, N. 7, P. 528-536, 2010.

BERGAMASCHI, A.; FRASOR, J.; BORGAN, K.; STANCULESCU, A.; JOHNSON, P.; ROWLAND, K.; WILEY, E.L.; KATZENELLENBOGEN, B.S. **14-3-3Z AS A PREDICTOR OF EARLY TIME TO RECURRENCE AND DISTANT METASTASIS IN HORMONE RECEPTOR-POSITIVE AND -NEGATIVE BREAST CANCERS**. BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, v. 137, P. 689-696, 2013.

BERTRANDI, A.; ERHET, C.; MAMCHAOUIT, K.; ZIAEI, S.; MAYER, M. DESGUERRE, I.; BONNE, G.; COIRAULT, C. **D.P.25 MUTATION IN LAMIN A/C GENE CAUSES MECHANOTRANSDUCTION DEFECTS IN HUMAN MYOBLASTS**. NEUROMUSCULAR DISORDERS, v. 22, P. 825, 2012.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GOLCALVES, A. **PROTEOMICS OF BREAST CANCER**. MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, v. 5, P. 1772-1786, 2006.

BIN GOH, W.W.; HOU LEE, Y.; RAMDZAN, Z.M.; CHUNG, M.C.M, WONG, L.; SERGOT, M.J. **A NETWORK-BASED MAXIMUM LINK APPROACH TOWARDS MS IDENTIFIES POTENTIALLY IMPORTANT ROLES FOR UNDETECTED ARRB1/2 AND ACTB IN LIVER CANCER PROGRESSION.** INTERNATIONAL JOURNAL BIOINFORMATICS RESEARCH AND APPLICATIONS, V. 8, P. 155-170, 2012.

BISCH, P.M. **PROTEÔMICA.** IN: LUÍS MIR. (ORG.) GENÔMICA. 1º. ED. SÃO PAULO: EDITORA ATHENEU. V. 1, P. 139-162, 2004.

BÖHM, D.; KELLER, K.; WEHRWEIN, N.; LEBRECHT, A.; SCHMIDT, M.; KÖLBL, H.; GRUS, F. **SERUM PROTEOME PROFILING OF PRIMARY BREAST CANCER INDICATES A SPECIFIC BIOMARKER PROFILE.** ONCOLOGY REPORTS, V. 26, P. 1051-1056, 2011.

BOMBONATI, A.; LERWILL, M.F. **METASTASES TO AND FROM THE BREAST.** SURGICAL PATHOLOGY, V. 5, P. 719-747, 2012.

BOMBARDIERI, E.; GIANNI, L.; BONADONNA, G. **BREAST CANCER: NUCLEAR MEDICINE IN DIAGNOSIS AND THERAPEUTICS OPTIONS.** BERLIN: SPRINGER, 2008.

BOMMER, U. **CELLULAR FUNCTION AND REGULATION OF THE TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOUR PROTEIN TCTP.** THE OPEN ALLERGY JOURNAL, V. 5, P. 19-32, 2012.

BRADBURY, A.R.; OLOPADE, O.I. **GENETIC SUSCEPTIBILITY TO BREAST CANCER.** REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS, V. 8, N. 3, P. 255-267, 2007.

BRADFORD, M.M. **A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING.** ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, V. 72, P 248-254, 1976.

BRUSIC, V.; MARINA, O.; WU, C. J.; REINHERZ, E. L. **PROTEOME INFORMATICS FOR CANCER RESEARCH: FROM MOLECULES TO CLINIC**. PROTEOMICS, v. 7, p. 976–991, 2007.

CARMONA, F.J.; VILLANUEVA, A.; VIDAL, A.; MUÑOZ, C.; PUERTAS, S.; PENIN, R.M.; GOMÀ, M.; LUJAMBIO, A.; PIULATS, J.M.; MESÍA, R.; SÁNCHEZ-CÉSPED, M.; MANÓS, M.; CONDOM, E.; ECCLES, S.A.; ESTELLER, M. **EPIGENETIC DISRUPTION OF CADHERIN-11 IN HUMAN CANCER METASTASIS**. JOURNAL OF PATHOLOGY, v. 228, n. 2, p. 230-240, 2012.

CAVALLI, L.R.; ELLSWORTH, R.E.; KLEIN, C.; VIALE, G. **BREAST AXILLARY LYMPH NODE METASTASIS**. INTERNATIONAL JOURNAL OF BREAST CANCER, 2011
DISPONÍVEL EM < [HTTP://WWW.HINDAWI.COM/JOURNALS/IJBC/2011/304697/](http://www.hindawi.com/journals/IJBC/2011/304697/)>
ACESSO REALIZADO EM DEZEMBRO DE 2012.

CAWTHORN, T.R.; MORENO, J.C.; DHARSEE, M.; TRAN-THANH, D.; ACKLOO, S.; HONG ZHU, P.; SARDANA, G.; CHEN, J.; KUPCHAK, P.; JACKS, L.M.; MILLER, N.A.; YOUNGSON, B.J.; IAKOVLEV, V.; GUIDOS, C.J.; VALLIS, K.A.; EVANS, K.R.; MCCREADY, D.; LEONG, W.L.; DONE, S.J. **PROTEOMIC ANALYSES REVEAL HIGH EXPRESSION OF DECORIN AND ENDOPLASMIN (HSP90B1) ARE ASSOCIATED WITH BREAST CANCER METASTASIS AND DECREASED SURVIVAL**. PLOS ONE, v.7, 2012. DISPONÍVEL EM < [HTTP://WWW.PLOSONE.ORG/ARTICLE/INFO%3Adoi%2F10.1371%2FJOURNAL.PONE.0030992](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0030992) > ACESSO REALIZADO EM DEZEMBRO DE 2012.

CAYADO-GUTIÉRREZ, N.; MONCALERO, V.L.; ROSALES, E.M.; BERÓN, W.; SALVATIERRA, E.E.; ALVAREZ-OLMEDO, D.; RADRIZZANI, M.; CIOCCA, D.R. **DOWNREGULATION OF Hsp27 (HSPB1) IN MCF-7 HUMAN BREAST CANCER CELLS INDUCES UPREGULATION OF PTEN**. CELL STRESS AND CHAPERONES, v. 18, p. 243-249, 2013.

CHEN, Y.; CHOU, C.; LYU, P.; YIN, H.; HUANG, F.; CHANG, W.W.; FAN, C.; TU, I.; LAI, T.; LIN, S.; , Y.; WU, C.; HUANG, S.; CHAN, H. **MITOCHONDRIAL PROTEOMICS ANALYSIS OF TUMORIGENIC AND METASTATIC BREAST CANCER MARKERS**. FUNCTIONAL & INTEGRATIVE GENOMICS, v. 11, p. 225–239, 2011.

CHIK, F.; SZYF, M.; RABBANI, S.A. **ROLE OF EPIGENETICS IN CANCER INITIATION AND PROGRESSION**. HUMAN CELL TRANSFORMATION: ROLE OF STEM CELLS AND THE MICROENVIRONMENT, v. 720, p. 91-104, 2012.

CHOI, J.C.; WU, W.; MUCHIR, A.; IWATA, S.; HOMMA, S.; WORMAN, H.J. **DUAL SPECIFICITY PHOSPHATASE 4 MEDIATES CARDIOMYOPATHY CAUSED BY LAMIN A/C (LMNA) GENE MUTATION**. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 287, p. 40513–40524, 2012.

CHU, P.; WU, E.; WEISS, L.M. **CYTOKERATIN 7 AND CYTOKERATIN 20 EXPRESSION IN EPITHELIAL NEOPLASMS: A SURVEY OF 435 CASES**. MODERN PATHOLOGY, v. 13, p. 962-72, 2000.

COSTA, GG. **ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**. 2010. F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NA ÁREA DE GENÉTICA) – DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2010.

CUNHA, R.B.; CASTRO, M.S.; FONTES, W. **ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PROTEÍNAS**. BIOLOGIA CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO, v. 36, p. 40-46, 2006.

DAVE, B.; MITTAL, V.; TAN, N.M.; CHANG, J.C. **EPITHELIAL–MESENCHYMAL TRANSITION, CANCER STEM CELLS AND TREATMENT RESISTANCE**. BREAST CANCER RESEARCH, v. 14, 2012.

DAVIS, M. A.; HANASH, S. **HIGH-THROUGHPUT GENOMIC TECHNOLOGY IN RESEARCH AND CLINICAL MANAGEMENT OF BREAST CANCER: PLASMA-BASED PROTEOMICS IN EARLY DETECTION AND THERAPY.** BREAST CANCER RESEARCH, V. 8, P. 217, 2006.

DWEK, M.; PEIRIS, D. **2-DE-BASED PROTEOMICS FOR THE ANALYSIS OF METASTASIS-ASSOCIATED PROTEINS.** METASTASIS RESEARCH PROTOCOLS. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, V. 878, P. 111-120, 2012.

DUPONT, A.; CORSEAU, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A.; SUSEN, S.; VINCENTELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. **THE PROTEOME AND SECRETOME OF HUMAN ARTERIAL SMOOTH MUSCLE CELLS.** PROTEOMICS, V. 5, P. 585–596, 2005.

EXPASY. DISPONÍVEL EM <[HTTP://WWW.EXPASY.CH/](http://www.expasy.ch/)> ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

FANG, W.; GOLDBERG, M.L.; POHL, N.M.; BI, X.; TONG, C.; XIONG, B.; KOH, T.J.; DIAMOND, A.M.; YANG, W. **FUNCTIONAL AND PHYSICAL INTERACTION BETWEEN THE SELENIUM-BINDING PROTEIN 1 (SBP1) AND THE GLUTATHIONE PEROXIDASE 1 SELENO PROTEIN.** CARCINOGENESIS, V. 31, P. 1360–1366, 2010.

GALVÃO, E.R.C.G.N.; MARTINS, L.M.S.; IBIAPINA, J.O.; ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.H. **BREAST CANCER PROTEOMICS: A REVIEW FOR CLINICIANS.** JOURNAL CANCER RESEARCH CLINICAL ONCOLOGY. V. 137, P. 915–925, 2011.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. DISPONÍVEL EM [HTTP://WWW.GELIFESCIENCES.COM/APTRIX/UPP01077.NSF/CONTENT/2D_ELECTROPHORESIS~2DELECTROPHORESIS_HANDBOOK](http://www.gelifesciences.com/aptrix/UPP01077.NSF/CONTENT/2D_ELECTROPHORESIS~2DELECTROPHORESIS_HANDBOOK), 2011.

GIBERT, B.; ECKEL, B.; FASQUELLE, L.; MOULIN, M.; BOUHALLIER, F.; GONIN, V.; MELLIER, G.; SIMON, S.; KRETZ-REMY, C.; ARRIGO, A.; DIAZ-LATOUD, C. **KNOCK DOWN OF HEAT SHOCK PROTEIN 27 (HspB1) INDUCES DEGRADATION OF SEVERAL PUTATIVE CLIENT PROTEINS.** PLoS ONE, v. 7, 2012
 DISPONÍVEL EM < [HTTP://WWW.PLOSONE.ORG/ARTICLE/INFO:DOI/10.1371/JOURNAL.PONE.0029719](http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0029719)>
 ACESSO REALIZADO EM MAR 2013.

GONZALEZ-ANGULO, A.M.; HENNESSY, B.T.; MERIC-BERNSTAM, F.; SAHIN A.; LIU, W.; JU, Z.; CAREY, M.S.; MYHRE,S.; SPEERS, C.; DENG,L.; BROADDUS, R.; LLUCH, A.; APARICIO,S.; BROWN, P.; PUSZTAI, L.; SYMMANS, W.F.; ALSNER, J.; OVERGAARD, J.; BORRESEN-DALE, A.; HORTOBAGYI, G.N.; COOMBES, K.R.; MILLS, G.B. **FUNCTIONAL PROTEOMICS CAN DEFINE PROGNOSIS AND PREDICT PATHOLOGIC COMPLETE RESPONSE IN PATIENT WITH BREAST CANCER.** CLINICAL PROTEOMICS, v. 8, 2011.

GOUDARZI, S.; SMITH, L.J.M.; SCHÜTZ, S.; HAFIZI, S. **INTERACTION OF DISC1 WITH THE PTB DOMAIN OF TENSIN2.** CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, 2012. DISPONÍVEL EM < [HTTP://LINK.SPRINGER.COM/ARTICLE/10.1007%2Fs00018-012-1228-6](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-012-1228-6)> ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

GRIFFITH, O.L.; GRAY, J.W. **OMIC APPROACHES TO PREVENTING OR MANAGING METASTATIC BREAST CANCER.** BREAST CANCER RESEARCH, v. 13, p. 1-11, 2011.

GUO, Y.; FU, Z.;VAN EYK J.E. **A PROTEOMIC PRIMER FOR THE CLINICIAN.** PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY, v. 4, p. 9-17, 2007.

GURZU, S.; JUNG, I. **ABERRANT PATTERN OF THE CYTOKERATIN 7/CYTOKERATIN 20 IMMUNOPHENOTYPE IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS WITH BRAF MUTATIONS.** PATHOLOGY – RESEARCH AND PRACTICE, v. 208, p. 163-166, 2012.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **TRATADO DE FISIOLOGIA MÉDICA**, 11ª ED. RIO DE JANEIRO:ELSEVIER, 2006.

HILL, J.J.; TREMBLAY, T.; PEN, A.; LI, J.; ROBOTHAM, A.C.; LENFERINK, A.E.G.; WANG, E.; O'CONNOR-MCCOURT, M.; KELLY, J.F. **IDENTIFICATION OF VASCULAR BREAST TUMOR MARKERS BY LASER CAPTURE MICRODISSECTION AND LABEL-FREE LC-MS**. JOURNAL OF PROTEOME, v. 10, p. 2479–2493, 2011.

HONDERMARCK, H.; VERCOUTTER-EDOUART, A.S.; RÉVILLION, F.; LEMOINE, J.; EL-YAZIDI-BELKOURA, I.; NURCOMBE, V.; PEYRAT, J.P. **PROTEOMICS OF BREAST CANCER FOR MARKER DISCOVERY AND SIGNAL PATHWAY PROFILING**. PROTEOMICS, v.1, p. 1216–1232, 2001.

IARC. **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER**. DISPONÍVEL EM <[HTTP://GLOBOCAN.IARC.FR/FACTSHEET.ASP](http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp)> ACESSO REALIZADO EM FEVEREIRO DE 2013.

IKEYA, H.; OKA, S.;YUKINO, S.; YANO, K.; SUZUKI, H.; NISHINARI, M.; UCHIDA, K.; NARUSE, K.; KUROSAKI, Y.; AOYAMA, N.; OGAWA, Z. **STABILITY AND REFERENCE INTERVAL OF SERUM PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM)**. JOURNAL OF ANALYTICAL BIO-SCIENCE, v. 35, 2012.

INCA. **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE**. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. TIPOS DE CÂNCER: CÂNCER DE MAMA. RIO DE JANEIRO. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.INCA.GOV.BR/ESTIMATIVA/2012/ESTIMATIVA20122111.PDF](http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf)>, ACESSO REALIZADO EM SETEMBRO DE 2012.

IOACHIM, H.L.; MEDEIROS, L.J. **LYMPH NODE PATHOLOGY**. 4ª ED, 2009. DISPONÍVEL EM

<[HTTP://BOOKS.GOOGLE.COM.BR/BOOKS?ID=HMFIFFDNbWC&PRINTSEC=FRONTCOVER#V=ONEPAGE&Q&F=FALSE.](http://books.google.com.br/books?id=HMFIFFDNbWC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false)> ACESSO REALIZADO EM DEZEMBRO 2012.

JACQUES, C.M.C.; PEREIRA, A.L.C.; MAIA, V.; CUZZI, T.; RAMOS-E-SILVA, M. **EXPRESSION OF CYTOKERATINS 10,13,14 AND 19 IN ORAL LICHEN PLANUS.** JOURNAL OF ORAL SCIENCE, V. 51, P. 355-365, 2009.

JONES, R.L.; CONSTANTINIDOU, A.; REIS-FILHO, J.S. **MOLECULAR CLASSIFICATION OF BREAST CANCER.** SURGICAL PATHOLOGY, V. 5, P. 701–717, 2012.

JONES, S.E. **METASTATIC BREAST CANCER: THE TREATMENT CHALLENGE.** CLINICAL BREAST CANCER V. 8, 224–233, 2008.

KANG, H.; KO, J.; JANG, S. **THE ROLE OF ANNEXIN A1 IN EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND INVASION OF BREAST CANCER CELLS.** BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, V. 423, P.188–194, 2012.

KANG, S.; MAENG, H.; KIM, B.G.; QING, G.M.; CHOI, Y.P.; KIM, H.Y.; KIM, P.S.; KIM, Y.; KIM, Y.H.; CHOI, Y.D.; CHO, N.H. **IN SITU IDENTIFICATION AND LOCALIZATION OF IGHA2 IN THE BREAST TUMOR MICROENVIRONMENT BY MASS SPECTROMETRY.** JOURNAL OF PROTEOMICS, V. 11, P. 4567–4574, 2012.

KIM, T.H.; SONG, J.; LLAGUNO, S.R.A.; MURNAN, E.; LIYANARACHCHI, S.; PALANICHAMY, K.; YI, J.; VIAPIANO, M.S.; NAKANO, I.; YOON, S.O.; WU, H.; PARADA, L.F.; KWON, C. **SUPPRESSION OF PEROXIREDOXIN 4 IN GLIOBLASTOMA CELLS INCREASES APOPTOSIS AND REDUCES TUMOR GROWTH.** PLOS ONE, V. 7, 2012.

KOLCH, W.; PITT, A. **FUNCTIONAL PROTEOMICS TO DISSECT TYROSINE KINASE SIGNALLING PATHWAYS IN CANCER.** NATURE, V.10, P. 618-629, 2010.

KORKOLA, J.; GRAY, J.W. **BREAST CANCER GENOMES—FORM AND FUNCTION.** GENETICS & DEVELOPMENT, v. 20, p. 4-14, 2010.

LEANDRO-GARCÍA, L.J.; LESKELA, S.; LANDA, I.; MONTERO-CONDE, C.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, E.; LETÓN, R.; CASCÓN, A.; ROBLEDO, M.; RODRÍGUEZ-ANTONA, C. **TUMORAL AND TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF THE MAJOR HUMAN B-TUBULIN ISOTYPES.** CYTOSKELETON, v. 67, p.214–223, 2010.

LEE, H.; LIM, C.; CHEONG, Y.; SINGH, M.; GAM, L. **COMPARISON OF PROTEIN EXPRESSION PROFILES OF DIFFERENT STAGES OF LYMPH NODES METASTASIS IN BREAST CANCER.** INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, v. 8, p. 353-362, 2012.

LI, J.; GROMOV, P.; GROMOVA, I.; MOREIRA, J.M.; TIMMERMANS-WIELENGA, V.; RANK, F.; WANG, K.; LI, S.; LI, H.; WIUF, C.; YANG, H.; ZHANG, X.; BOLUND, L.; CELIS, J.E. **OMICS-BASED PROFILING OF CARCINOMA OF THE BREAST AND MATCHED REGIONAL LYMPH NODE METASTASIS.** PROTEOMICS, v.8, p. 5038–5052, 2008.

LI, G.; CAIA, M.; FU, D.; CHEN, K.; SUNA, M.; CAI, Z.; CHENG, B. **HEAT SHOCK PROTEIN 90B1 PLAYS AN ONCOGENIC ROLE AND IS A TARGET OF MICRORNA-223 IN HUMAN OSTEOSARCOMA.** CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, v. 30, p. 1481-90, 2012.

LI, M.; ZHANG, H.; WANG, J.; PAN, Y. **A NEW ESSENTIAL PROTEIN DISCOVERY METHOD BASED ON THE INTEGRATION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTION AND GENE EXPRESSION DATA.** BMC SYSTEMS BIOLOGY, v. 6, p. 1-19, 2012.

LIU, J.; ZHAN, X.; LI, M.; LI, G.; ZHANG, P.; XIAO, Z.; SHAO, M.; PENG, F.; HU, R.; CHEN, Z. **MITOCHONDRIAL PROTEOMICS OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA METASTASIS.** BMC MEDICAL GENOMICS, v. 5, 2012.

LONDONO, C.; OSORIO, C.; GAMA, V.; ALZATE, O. **MORTALIN, APOPTOSIS, AND NEURODEGENERATION.** BIOMOLECULES, V. 2, P. 143-164, 2012.

LOPES, N.; PAREDES, J.; COSTA, J.L.; YLSTRA, B.; SCHMITT, F. **VITAMIN D AND THE MAMMARY GLAND: A REVIEW ON ITS ROLE IN NORMAL DEVELOPMENT AND BREAST CANCER.** BREAST CANCER RESEARCH, V. 14, 2012.

MADSEN, E.V.E., VAN DALEN, J., VAN GORP, J., VAN OORT, P.M.P., VAN DALEN, T. **FROZEN SECTION ANALYSIS OF SENTINEL LYMPH NODES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER DOES NOT IMPAIR THE PROBABILITY TO DETECT LYMPH NODE METASTASES.** VIRCHOWS ARCHIV, V. 460, P. 69-76, 2012.

MALIK, S. FU, L; JURAS, D.J.; KARMALI, M.; WONG, B.Y.L.; GOZDZIK, A.; COLE, D.E.C. **COMMON VARIANTS OF THE VITAMIN D BINDING PROTEIN GENE AND ADVERSE HEALTH OUTCOMES.** CRITICAL REVIEWS IN CLINICAL LABORATORY SCIENCES, V. 50, P. 1–22, 2013.

MAN-NI, S.; XIAO-QIAN, L.; JING-YI, Z.; DONG-MING, L.; YU-CHEN, H. **SIGNIFICANCE OF THE EXPRESSION OF RHO-GDP DISSOCIATION INHIBITOR IN LUNG SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND ADENOCARCINOMA.** JOURNAL OF CANCER RESEARCH, V. 19, P. 287-290, 2007.

MARKIEWICZ, A.; AHREND, T.; WEŁNICKA-JAŚKIEWICZ, M.; SEROCZYŃSKA, B.; SKOKOWSKI, J.; JAŚKIEWICZ, J.; SZADE, J.; BIERNAT, W.; JŹACZEK, A. **EXPRESSION OF EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION-RELATED MARKERS IN LYMPH NODE METASTASES AS A SURROGATE FOR PRIMARY TUMOR METASTATIC POTENTIAL IN BREAST CANCER.** JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, V.10, 2012.

MARLEY, A.; VON ZASTROW, M. **DISC1 REGULATES PRIMARY CILIA THAT DISPLAY SPECIFIC DOPAMINE RECEPTORS**, 2010. DISPONÍVEL EM <
[HTTP://WWW.PLOSONE.ORG/ARTICLE/INFO%3ADOI%2F10.1371%2FJOURNAL.PONE.0010902](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010902)> ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2010.

MARTÍNEZ-CORRAL, I.; OLMEDA, D.; DIÉGUEZ-HURTADO, R.; TAMMELA, T.; ALITALO, K.; ORTEGA, S. **IN VIVO IMAGING OF LYMPHATIC VESSELS IN DEVELOPMENT, WOUND HEALING, INFLAMMATION, AND TUMOR METASTASIS**. PNAS, v. 109, N. 16, P. 6223-6228, 2012.

MAVADDAT, N.; ANTONIOU, A.C.; EASTON, D.F.; GARCIA-CLOSAS, M. **GENETIC SUSCEPTIBILITY TO BREAST CANCER**. MOLECULAR ONCOLOGY. V. 4. P. 174-191, 2010.

MILIOLI, H.H.Z. **ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CARCINOMAS ESPORÁDICOS PRIMÁRIOS DE MAMA E METÁSTASES AXILARES CORRESPONDENTES**. 2011. 219 F DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NA ÁREA DE GENÉTICA) – DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2011.

MINAFRA, I.P.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A.; MINAFRA, S. **EXPANDING THE PROTEIN CATALOGUE IN THE PROTEOME REFERENCE MAP OF HUMAN BREAST CANCER CELLS**. PROTEOMICS, v. 6, P. 2609–2625, 2006.

MISHRA, S.; MURPHY, B.L.G.; NYOMBA, G.; MURPHY, L.J. **PROHIBITIN: A POTENTIAL TARGET FOR NEW THERAPEUTICS**. MOLECULAR MEDICINE, v.11, P. 192-197, 2005.

MISHRA, S.; ANDE, S.R.; NYOMBA, B.L.G. **THE ROLE OF PROHIBITIN IN CELL SIGNALING**. FEBS JOURNAL, v. 277, P. 3937–3946, 2010.

MOELLER, A.; ZHAO, C.; FRIED, M.G.; WILSON-KUBALEK, E.M.; CARRAGHER, B.; WHITEHEART, S.W. **NUCLEOTIDE-DEPENDENT CONFORMATIONAL CHANGES IN THE N-ETHYLMALEIMIDE SENSITIVE FACTOR (NSF) AND THEIR POTENTIAL ROLE IN SNARE COMPLEX DISASSEMBLY.** JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, v. 177, p. 335–343, 2012.

MOHD-PADIL, H.; MOHD-ADNAN, A.; GABALDON, T. **PHYLOGENETIC ANALYSES UNCOVER A NOVEL CLADE OF TRANSFERRIN IN NON-MAMMALIAN VERTEBRATES.** MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION, v. 30, p. 894-905, 2013.

NODALE, C.; SHEFFER, M.; JACOB-HIRSCH, J.; FOLGIERO, V.; FALCIONI, R.; AIELLO, A.; GARUFI, A.; RECHAVI, G.; GIVOL, D.; D'ORAZI, G. **HIPK2 DOWNREGULATES VIMENTIN AND INHIBITS BREAST CANCER CELL INVASION.** CANCER BIOLOGY & THERAPY, v. 13, p. 1–8, 2012.

NAGANO-ITO, M.; ICHIKAWA, S. **BIOLOGICAL EFFECTS OF MAMMALIAN TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) ON CELL DEATH, PROLIFERATION, AND TUMORIGENESIS.** BIOCHEMISTRY RESEARCH INTERNATIONAL, 2012. DISPONÍVEL EM [HTTP://WWW.HINDAWI.COM/JOURNALS/BCRI/2012/204960/](http://www.hindawi.com/journals/bcri/2012/204960/) ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

NAYDENOV, N.G.; HARRIS, G.; BROWN, B.; SCHAEFER, K.L.; DAS, S.K.; FISHER, P.B.; IVANOV, A.I. **LOSS OF SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ATTACHMENT PROTEIN A (ASNAF) INDUCES EPITHELIAL CELL APOPTOSIS VIA DOWN-REGULATION OF BCL-2 EXPRESSION AND DISRUPTION OF THE GOLGI.** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 287, p. 5928–5941, 2012.

NOLA, S.; SIN, S.; BONIN, F.; LIDEREAU, R.; DRIOUCH, K. **A METHODOLOGICAL APPROACH TO UNRAVEL ORGAN-SPECIFIC BREAST CANCER METASTASIS.** JOURNAL OF MAMMARY GLAND BIOLOGY AND NEOPLASIA, v.17, p. 135-145 2012.

OLDENGURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER. H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P.; **GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR BREAST CANCER: HOW MANY MORE GEES TO BE FOUND?** CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY/HEMATOLOGY, V. 63, P. 125-149, 2007.

OLIVEIRA, N.F.P.; PLANELLO, A.C.; ANDIA, D.C.; PARDO, A.P.S. **METILAÇÃO DE DNA E CÂNCER.** REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA; V. 56, P. 493-499, 2010.

OZCAN, A.; KARSLIOGLU, Y.; ONGURU, O.; KURT, B.; GUNAL, A.; GUNHAN, O.; FIRAT, B.A. **CYTOKERATIN 7 AND ANTIMITOCHONDRIAL ANTIBODY EXPRESSIONS IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RENAL EPITHELIAL NEOPLASMS WITH EOSINOPHILIC CYTOPLASM.** JOURNAL OF INTERDISCIPLINARY HISTOPATHOLOGY, V. 1, P. 11-15, 2012.

PAIVA, F.; DUARTE-PEREIRA, S.; COSTA, V.L.; RAMALHO-CARVALHO, J.; PATRÍCIO, P.; RIBEIRO, F.R.; LOBO, F.; OLIVEIRA, J.; JERÓNIMO, C.; HENRIQUE, R. **FUNCTIONAL AND EPIGENETIC CHARACTERIZATION OF THE KRT19 GENE IN RENAL CELL NEOPLASMS.** DNA AND CELL BIOLOGY, V. 30, P. 85-90, 2011.

PALANDE, K.K.; BEEKMAN, R.; MEEREN VAN DER, L.E.; BEVERLOO, H.B.; VALK, P.J.M.; TOUW, I.P. **THE ANTIOXIDANT PROTEIN PEROXIREDOXIN 4 IS EPIGENETICALLY DOWN REGULATED IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA.** PLoS ONE, v. 6, 2011.

PALEY, E.L. **CHAPERON-LIKE ACTIVATION OF SERUM-INDUCIBLE TRYPTOPHANYL-TRNA SYNTHETASE PHOSPHORYLATION THROUGH REFOLDING AS A TOOL FOR ANALYSIS OF CLINICAL SAMPLES.** TRANSLATIONAL ONCOLOGY, V. 4, P. 377-389, 2011.

PARK, Y.; JEONG, J.; LEE, H.; MUN, J.Y.; KIM, J.; LEE, J.S.; NGUYEN, M.D.; HAN, S.S.; SUH, P.; PARKA, S.K. **DISRUPTED-IN-SCHIZOPHRENIA1 (DISC1) PLAYS ESSENTIAL ROLES IN MITOCHONDRIA IN COLLABORATION WITH MITOFILIN.** PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, v. 107, p. 17785–17790, 2010.

PEDDI, P.F.; ELLIS, M.J.; MA, C. **MOLECULAR BASIS OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER AND IMPLICATIONS FOR THERAPY.** INTERNATIONAL JOURNAL OF BREAST CANCER, 2012. DISPONÍVEL EM <
[HTTP://WWW.HINDAWI.COM/JOURNALS/IJBC/2012/217185/](http://www.hindawi.com/journals/IJBC/2012/217185/) >. ACESSO EM SETEMBRO DE 2012.

PODO, F.; BUYDENS, L.M.C.; DEGANI, H.; HILHORST, R.; KLIPP, E.; GRIBBESTAD I.S.; VAN HUFFEL, S.; VAN LAARHOVEN, H. W.M.; LUTS, J.; MONLEON, D.; POSTMA, G.J.; SCHNEIDERHAN-MARRA, N.; SANTORO, F.; WOUTERS, H.; RUSSNES, H.G.; SØRLIE, T.; TAGLIABUE, E.; BØRRESEN-DALE, A. **TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER: PRESENT CHALLENGES AND NEW PERSPECTIVES.** MOLECULAR ONCOLOGY, v. 4, p. 209-229, 2010.

POLYAK, K.; VOGT, P.K. **PROGRESS IN BREAST CANCER RESEARCH.** PNAS, v.109, N9, p. 2715-2717, 2012.

POZUELO-RUBIO. **14-3-3 PROTEINS ARE REGULATORS OF AUTOPHAGY.** CELLS, v.1, p. 754-773, 2012.

QIN, X.; LING, B.X. **PROTEOMIC STUDIES IN BREAST CANCER (REVIEW).** ONCOLOGY LETTERS, v. 3, p. 735-743, 2012.

RAY, S.; REDDY, P. J.; JAIN, R.; GOLLAPALLI, K.; MOIYADI, A.; SRIVASTAVA, S. **PROTEOMIC TECHNOLOGIES FOR THE IDENTIFICATION OF DISEASE**

BIOMARKERS IN SERUM: ADVANCES AND CHALLENGES AHEAD. PROTEOMICS, V. 11, P. 2139-2161, 2011.

REIS-FILHO, J.S; PUSZTAI, L. **GENE EXPRESSION PROFILING IN BREAST CANCER: CLASSIFICATION, PROGNOSTICATION, AND PREDICTION.** THE LANCET, V.378, N. 9805, P. 1812-1823, 2011.

REIS-FILHO, J.S. **TRIPLE NEGATIVE AND BASAL-LIKE BREAST CANCER: ONE OR MANY DISEASES?** IMPLICATIONS FOR SURGICAL PATHOLOGIST. DISPONÍVEL EM < [HTTP://WWW.USCAP.ORG/SITE~/98TH/PDF/COMPANION03H03.PDF](http://www.uscap.org/site~/98th/pdf/companion03h03.pdf) > ACESSO REALIZADO EM FEVEREIRO DE 2013.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ANÁLISE DE PROTEOMAS.** COMUNICADO TÉCNICO EMBRAPA, P. 1-11, 2005.

RODENHISER, D.I.; ANDREWS, J.D.; VANDENBERG, T.A.; CHAMBERS, A.F. **GENE SIGNATURES OF BREAST CANCER PROGRESSION AND METASTASIS.** BREAST CANCER RESEARCH, V. 13, P. 1-8, 2011.

SÁNCHEZ-QUILES, V.; SEGURA, V.; BIGAUD, E.; HE, B.; O'MALLEY, B.W.; SANTAMARÍA, E.; PRIETO, J.; CORRALES, F.J. **PROHIBITIN-1 DEFICIENCY PROMOTES INFLAMMATION AND INCREASES SENSITIVITY TO LIVER INJURY.** JOURNAL OF PROTEOMICS, V. 75, P.5783–5792, 2012.

SANGUANSIN, S.; PETMITR, S.; CHAROENRAT, P.O.; PONGSTAPORN, W. **ASSOCIATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE OMEGA GENE POLYMORPHISMS WITH PROGRESSION OF HEAD AND NECK CANCER.** MOLECULAR BIOLOGY REPORT, V. 39, P. 10915–10920, 2012.

SAVINO, R.; PADUANO, S.; PREIANÒ, M.; TERRACCIANO, R. **THE PROTEOMICS BIG CHALLENGE FOR BIOMARKERS AND NEW DRUG-TARGETS DISCOVERY.** INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, v. 13, p. 13926-13948, 2012.

SCHULTE, J. **PEROXIREDOXIN 4: A MULTIFUNCTIONAL BIOMARKER WORTHY OF FURTHER EXPLORATION.** BMC MEDICINE, v. 9. 2011.

SETHI, N.; KANG, Y. **UNRAVELLING THE COMPLEXITY OF METASTASIS — MOLECULAR UNDERSTANDING AND TARGETED THERAPIES.** NATURE, v. 11, p. 735-748, 2011.

SHEN, D.; CHANG, H.R.; CHEN, Z.; HE, J.; LONSBERRY, V.; ELSHIMALI, Y.; CHIA, D.; SELIGSON, D.; GOODGLICK, L.; NELSON, S.F.; GORNBEIN, J.F. **LOSS OF ANNEXIN A1 EXPRESSION IN HUMAN BREAST CANCER DETECTED BY MULTIPLE HIGH-THROUGHPUT ANALYSES.** BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, v. 326, p. 218–227, 2005.

SHEN, D.; NOORAIE, F.; ELSHIMALI, Y.; LONSBERRY, V.; HE, J.; BOSE, S.; CHIA, D.; SELIGSON, D.; CHANG, H.R.; GOODGLICK, L. **DECREASED EXPRESSION OF ANNEXIN A1 IS CORRELATED WITH BREAST CANCER DEVELOPMENT AND PROGRESSION AS DETERMINED BY A TISSUE MICROARRAY ANALYSIS.** HUMAN PATHOLOGY, v. 37, p. 1583–1591, 2006.

SHEN, N.; GUO, L.; YANG, B.; JIN, Y.; DING, J. **STRUCTURE OF HUMAN TRYPTOPHANYL-TRNA SYNTHETASE IN COMPLEX WITH TRNA TRP REVEALS THE MOLECULAR BASIS OF TRNA RECOGNITION AND SPECIFICITY.** NUCLEIC ACIDS RESEARCH, v. 34, 3246–3258, 2006.

SHI, H.; HAYES, M.T.; KIRANA, C.; MILLER, R.J.; KEATING, J.P.; STUBBS, R.S. **OVEREXPRESSION OF AMINOACYLASE 1 IS ASSOCIATED WITH COLORECTAL**

CANCER PROGRESSION. HUMAN PATHOLOGY, 2013. DISPONÍVEL EM
<[HTTP://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0046817712003590](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817712003590)>
ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

SILVEIRA, G.L.P. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO INDUZIDA POR
CHOQUE TÉRMICO EM *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*. 2009. 63 F. DISSERTAÇÃO
(MESTRADO EM CIÊNCIAS-BIOQUÍMICA) – SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2009.

SINGH, M.; HUNTA,C.R.; PANDITAB, R.K.; KUMARA,R.; YANGC,C.;
HORIKOSHIA,N.; BACHOOD, R.; SERAGA,S.; STORYA, M.D.; SHAYB, J.W.;
POWELLE, S.N.; GUPTAA,A.; JEFFERYF, J.; PANDITAE, S.; CHENA, B.P.C.;
DECKBARG, D.; LÖBRICHG, M.; YANGE, Q.; KHANNAF, K.K.; WORMANH,
H.J.; PANDITA, T.K. LAMIN A/C DEPLETION ENHANCES DNA DAMAGE-INDUCED
STALLED REPLICATION FORK ARREST. MOLECULAR AND CELULLAR BIOLOGY, V. 33,
P. 1210-1222, 2013.

SOMIARI, R.I.; SOMIARIB, S.; RUSSELLA, S.; SHRIVERC, C.D. PROTEOMICS OF
BREAST CARCINOMA. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, V. 815, P. 215–225, 2005.

SUN, B.; ZHANG,S.; ZHANG, D.; LI,Y.; ZHAO,X.; LUO, Y.; GUO, Y.
IDENTIFICATION OF METASTASIS-RELATED PROTEINS AND THEIR CLINICAL
RELEVANCE TO TRIPLE-NEGATIVE HUMAN BREAST CANCER. CLINICAL CANCER
RESEARCH, V. 14, P. 7050-7059, 2008.

SZABO, Z.; SZOMOR, J.S.; FOELDI, I.; JANAKY, T. MASS SPECTROMETRY-BASED
LABEL FREE QUANTIFICATION OF GEL SEPARATED PROTEINS. JOURNAL OF
PROTEOMICS, V. 75, P. 5544–5553, 2012.

TAN, H.T.; LEE, Y.H.; CHUNG, M.C.M. CANCER PROTEOMICS. MASS
SPECTROMETRY REVIEWS, V. 31, P. 583-605, 2012.

TIEZZI, D.G.; VALEJO, F.A.M.; NAI, G.A.; TIEZZI, M.G. **LINFONODO-SENTINELA NO CÂNCER DE MAMA ACESSÓRIA: RELATO DE CASO.** REVISTA BRASILEIRA DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, V. 28, N. 1, P. 50-53, 2006.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. **COMPREHENSIVE MOLECULAR PORTRAITS OF HUMAN BREAST TUMOURS.** NATURE, V.490, P. 61-70, 2012.

THEISS, A.L.; SITARAMAN, S.V. **THE ROLE AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF PROHIBITIN IN DISEASE.** BIOCHIM BIOPHYS ACTA, V.1813, P. 1137-43, 2011.

UNIPROTKB. **UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE.** DISPONÍVEL EM <
[HTTP://WWW.UNIPROT.ORG/UNIPROT/](http://www.uniprot.org/uniprot/)> ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

ULIRSCH, J.; FAN, C.; KNAFL, G.; WU, M.J.; COLEMAN, B.; PEROU, C.M.; SWIFT-SCANLAN, T.; **VIMENTIN DNA METHYLATION PREDICTS SURVIVAL IN BREAST CANCER.** BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, V. 137, P. 383-396, 2013.

VALENTE, S.A., LEVINE, G.M., SILVERSTEIN, M.J., RAYHANABAD, J.A., WENG-GRUMLEY, J.G., JI, L., HOLMES, D.R., SPOSTO, R.,SENER, S.F. **ACCURACY OF PREDICTING AXILLARY LYMPH NODE POSITIVITY BY PHYSICAL EXAMINATION, MAMMOGRAPHY, ULTRASONOGRAPHY, AND MAGNETIC RESONANCE IMAGING.** ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY, V.19, N.6, P. 1825-1830, 2012.

VALENTIN, M.D; DA SILVA, S.D.; PRIVAT, M.; ALAOUI-JAMALI, M.; BIGNON, Y. **MOLECULAR INSIGHTS ON BASAL-LIKE BREAST CANCER.** BREAST CANCER RESEARCH TREATMENT, V.134, P. 21-30, 2012.

VAN SCHOONEVELD, E; WOUTERS, M.C.A.; VAN DER AUWERA, I.; PEETERS, D.J.; WILDIERS, H.; VAN DAM, P.A; VERGOTE, I.; VERMEULEN, P.B.; DIRIX, L.Y.; VAN LAERE, S.J. **EXPRESSION PROFILING OF CANCEROUS AND NORMAL BREAST TISSUES IDENTIFIES MICRORNAs THAT ARE DIFFERENTIALLY**

EXPRESSED IN SERUM FROM PATIENTS WITH (METASTATIC) BREAST CANCER AND HEALTHY VOLUNTEERS. BREAST CANCER RESEARCH, V. 14, P. 1-16, 2012.

VASCONCELOS, D.S.; DA SILVA, F.P.E.; QUINTANA, L.G.; ANSELMO, N.P.; OTHMAN, M.A.K.; LIEHR, T.; DE OLIVEIRA, E.H.C. **NUMERICAL ABERRATION OF CHROMOSOME 17 AND TP53 IN BRAIN METASTASES DERIVED FROM BREAST CANCER.** GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH, v. 4, 2013.

VEECK, J.; ESTELLER, M. **BREAST CANCER EPIGENETICS: FROM DNA METHYLATION TO MICRORNAs.** JOURNAL MAMMARY GLAND BIOLOGY NEOPLASIA, v. 15, P. 5-17, 2010.

VASILJEVIC, N.; AHMAD, A.S.; BEESLEY, C.; THORAT, M.A.; FISHER, G.; BERNEY, D.M.; MØLLER, H.; YU, Y.; LU, Y-L.; CUZICK, J.; FOSTER, C.S.; LORINCZ, A.T. **ASSOCIATION BETWEEN DNA METHYLATION OF HSPB1 AND DEATH IN LOW GLEASON SCORE PROSTATE CANCER.** PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISEASE, v. 16, P. 35–40, 2013.

VELASCO-VELÁZQUEZ, M.; JIAO, X.; DE LA FUENTE, M.; PESTELL, T.G.; ERTEL, A.; LISANTI, M.P.; PESTELL, R.G. **CCR5 ANTAGONIST BLOCKS METASTASIS OF BASAL BREAST CANCER CELLS.** CANCER RESEARCH, v.72, N. 15, P. 3839–3850, 2012.

VERGARA, D.; SIMEONE, P.; DEL BOCCIO, P.; TOTO, C.; PIERAGOSTINO, D.; TINELLI, A.; ACIERNO, R.; ALBERTI, S.; SALZET, M. GIANNELLI, G.; SACCHETTA, P.; MAFFIA, M. **COMPARATIVE PROTEOME PROFILING OF BREAST TUMOR CELL LINES BY GEL ELECTROPHORESIS AND MASS SPECTROMETRY REVEALS AN EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION ASSOCIATED PROTEIN SIGNATURE.** MOLECULAR BIOSYSTEMS, 2013. DISPONÍVEL EM <
[HTTP://PUBS.RSC.ORG/EN/CONTENT/ARTICLELANDING/2013/MB/C2MB25401H](http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/mb/c2mb25401h)>
 ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

WANG, X.; SHAPSES, S.A.; WEI, S.; SUKUMAR, D.; GHOSH, J. **VITAMIN D BINDING PROTEIN LEVELS IN FEMALE PATIENTS WITH PRIMARY HYPERPARATHYROIDISM.** ENDOCRINE PRACTICE, 2013. DISPONÍVEL EM < [HTTP://AACE.METAPRESS.COM/CONTENT/L780033123752k60/](http://aace.metapress.com/content/L780033123752k60/)> ACESSO REALIZADO EM MARÇO DE 2013.

WARMOES, M.; JASPERS, J.E.; PHAM, T.V.; PIERSMA, S.R.; OUDGENOEG, G.; MASSINK, M.P.G.; WAISFISZ, Q.; ROTTENBERG, S.; BOVEN, E.; JONKERS, J.; JIMENEZ, C.R. **PROTEOMICS OF MOUSE BRCA1-DEFICIENT MAMMARY TUMORS IDENTIFIES DNA REPAIR PROTEINS WITH DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE IN HUMAN BREAST CANCER.** MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, v. 11, 2012. DISPONÍVEL EM < [HTTP://WWW.MCPONLINE.ORG/CONTENT/11/7/M111.013334.FULL.PDF+HTML?SID=B0182CC7-A813-408E-9DAA-CCA02884343D](http://www.mcponline.org/content/11/7/M111.013334.full.pdf+html?SID=B0182CC7-A813-408E-9DAA-CCA02884343D) >. ACESSO EM SETEMBRO DE 2012.

WEINBERG, R.A. **A BIOLOGIA DO CÂNCER.** PORTO ALEGRE: ARTMED, 2008.

WHELAN, S.A.; HE, J.; LU, M.; SOUDA, P.; SAXTON, R.; FAULL, K.F.; WHITELEGGE, J.P.; CHANG, H. **MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) IDENTIFIED PROTEOMIC BIOSIGNATURES OF BREAST CANCER IN PROXIMAL FLUID.** JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, v. 11, p. 5034-5045, 2012.

WILKER, E.; YAFFE, M.B. **14-3-3 PROTEINS—A FOCUS ON CANCER AND HUMAN DISEASE.** JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, v. 37 p. 633-642, 2004.

WINDEN, A.W.J.O.; VERMEULE, R.C.H.N.; PEETERS, P.H.M.; BEIJNEN, J.H.; VAN GILS, C.H. **EARLY DIAGNOSTIC PROTEIN BIOMARKERS FOR BREAST CANCER: HOW FAR HAVE WE COME?** BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, v. 134, n. 1, p. 1-12, 2012.

YOM, C.K.; HAN, W.; KIM, S.; KIM, H.S; SHIN, H.; CHANG, J.; KOO, M.; NOH, D.; MOON, B. **CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANNEXIN A1 EXPRESSION IN BREAST CANCER.** JOURNAL OF BREAST CANCER, V. 14, P. 262-268, 2011.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA C.T.B.V.; LICHTIG, J. **DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS VIA ESPECTROFOMETRIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS EXISTENTES.** QUIMICA NOVA, V. 21, P. 787-793, 1998.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; DAGHER, M.; SHACTER, E. **RHO GDP DISSOCIATION INHIBITOR PROTECTS CANCER CELLS AGAINST DRUG-INDUCED APOPTOSIS.** CANCER RESEARCH, V. 65, P. 6054-6061, 2005.

ZHANG, D.; LIANG, X.; HE, X.; ALIPUI, O.D.; YANG, S.; SCHULZ, H. **Δ 3,5, Δ 2,4-DIENOYL-CoA ISOMERASE IS A MULTIFUNCTIONAL ISOMERASE A STRUCTURAL AND MECHANISTIC STUDY.** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, V. 276, P. 13622-13627, 2001.

ZHANG, J.; ZHAN, N.; DONG, W. **ALTERED EXPRESSION OF SELENIUM-BINDING PROTEIN 1 IN GASTRIC CARCINOMA AND PRECURSOR LESIONS.** MEDICAL ONCOLOGY, V. 28, P. 951–957, 2011.

ZHANG, L.; JI, Q.; NI, Z.; SUN, J. **PROHIBITIN INDUCES APOPTOSIS IN BGC823 GASTRIC CANCER CELLS THROUGH THE MITOCHONDRIAL PATHWAY.** ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION, VOL 13, P. 3803-3807, 2012.

ZWERGER, M.; JAALOUK, D.E.; LOMBARDI, M.L.; ISERMANN, P.; MAUERMANN⁵, M.; DIALYNAS, G. HERRMANN, H.; WALLRATH, L.L.; LAMMERDING, J. **MYOPATHIC LAMIN MUTATIONS IMPAIR NUCLEAR STABILITY IN CELLS AND TISSUE AND DISRUPT NUCLEO-CYTOSKELETAL COUPLING.** HUMAN MOLECULAR GENETICS, P. 1–15, 2013.

APÊNDICE

MATERIAIS E MÉTODOS

Abordagem Ética e Experimental

Este trabalho faz parte de um amplo estudo na área da Genética do Câncer de Mama e foi aprovado pelo Comitê de Ética para a pesquisa em seres humanos do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba – PR. Processo número 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003. As amostras foram obtidas de pacientes com câncer de mama, em diferentes estágios clínicos, atendidas no HNSG e no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), ambos de Curitiba-PR. O estudo foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética da UFPR.

Caracterização da amostra

O procedimento inicial foi realizado em sete amostras de pacientes com diagnóstico de câncer de mama, do tipo Carcinoma Ductal Invasor, submetidas a procedimentos cirúrgicos para a remoção de linfonodos axilares, nos anos de 2011 e 2012 (Tabela 2). As pacientes foram convidadas a participarem do estudo, firmando um termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III), que autoriza a coleta do material biológico. Nesta ocasião, foi realizada uma entrevista, para obtenção de dados familiares e epidemiológicos, através de questionário estruturado (Anexo IV). Os dados clínicos foram obtidos através de prontuários médicos. Das amostras que compõem este trabalho, apenas a amostra CP 667 não fez parte do trabalho de Dissertação de Mestrado de Heloisa Helena Zaccaron Milioli.

No grupo amostral, a média de idade das pacientes foi 62,14 anos \pm 7,62 anos. Histologicamente, os tumores foram avaliados de acordo com a

diferenciação celular, formação do túbulo/glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas. Cerca de 28,6% das pacientes possuíram tumores bem diferenciados (grau I), 57,1% moderadamente diferenciado (grau II) e 14,3 pouco diferenciados (grau III). Quanto a presença de RE e RP, 71,4% das pacientes eram positivas quanto a estes receptores e 28,6% apresentaram negatividade.

Amostra	Idade	Tipo Histológico	Grau	Tamanho (nm)	LP/TL	RE	RP
CP 622	71 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	I	30	P(18/19)	P	P
CP 630	49 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	I	15	P(06/30)	P	P
CP 633	71 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	II	40	P(26/29)	P	P
CP 641	58 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	II	100	P(01/10)	N	N
CP 644	61 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	III	35	P(07/07)	N	N
CP 645	63 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	II	58	P(03/29)	P	P
CP 667	62 anos	Carcinoma Ductal Invasivo	II	60	P(09/28)	P	P

QUADRO 2 - Caracterização do grupo amostral

FONTE: O autor, 2013.

LEGENDA: LP – Número de linfonodos positivos; e TL – número total de linfonodos analisados; RE – Receptor de estrogênio; RP – receptor de progesterona; P – positivo; N – negativo.

Coleta do material

Durante o procedimento cirúrgico, foram obtidas amostras de tumores primários e linfonodos axilares, analisadas em seguida pelo patologista responsável, antes de qualquer procedimento de preservação. Os fragmentos removidos foram coletados em tubos de centrifugação de 15mL devidamente identificadas e, em seguida, encaminhados ao LabCHO. As amostras foram mantidas a 4°C, por no máximo dois dias, até o processamento.

Processamento da amostra

No fluxo laminar, o material recebido foi disposto sobre uma Placa de Petri, à temperatura ambiente, para a remoção de tecidos adjacentes, como vasos sanguíneos e gordura, que foram posteriormente descartados. O material foi fragmentado com o auxílio de pinças e tesouras estéreis e em seguida, transferido para microtubos de 1,5mL, sendo estocados a -80°C para futura extração das proteínas.

Análise proteômica

Extração e Quantificação das proteínas

A quantidade de amostra utilizada nesta fase variou de 100mg até 400mg de acordo com a disponibilidade do material. Nas amostras CP 641, CP 645 e CP 667 foi realizada a extração e quantificação de proteínas, as amostras CP 622, CP 630, CP 633 e CP 644 foi utilizado os géis previamente preparados devido a indisponibilidade de material.

A extração de proteínas envolve a solubilização, desnaturação e redução de proteínas que sob a ação dos reagentes a elas aplicada tornam-se solubilizadas em solução.

Amostra Tumor Primário	Quantidade utilizada (g)	Concentração proteica (µg/µL)
CP 622	0,354	13,50
CP 630	0,400	16,48
CP 633	0,400	8,36
CP 641	0,400	8,94
CP 644	0,383	17,50
CP 645	0,204	7,31

CP 667	0,205	14,93
--------	-------	-------

QUADRO 3 - Quantificação para as amostras tumorais.
FONTE: O autor, 2013.

Amostra Linfonodo Axilar	Quantidade utilizada (g)	Concentração proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
CP 622	0,299	17,96
CP 630	0,342	23,64
CP 633	0,400	22,14
CP 641	0,200	9,28
CP 644	0,101	11,28
CP 645	0,204	9,62
CP 667	0,205	16,77

QUADRO 4 - Quantificação para as amostras linfonodais.
FONTE: O autor, 2013.

Os extratos proteicos foram obtidos pelas lises química e mecânica utilizadas simultaneamente. Na primeira, foi utilizado um tampão de lise contendo 7M de ureia, 2M de tiourea, 40mM de tris e 4% de CHAPS – detergente não iônico), adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). A lise mecânica ocorreu utilizando-se um triturador elétrico (homogeneizador). Foram adicionadas as amostras, 500 μL de tampão de lise e 1 μL de inibidor de protease (PMSF) aos tubos, com posterior homogeneização. Na sequência, as amostras foram deixadas em banho de gelo por 30 minutos. O processo se repetiu mais duas vezes com o acréscimo de 300 μL de tampão de lise e 1 μL de inibidor de protease, homogeneização e banho de gelo e 200 μL de tampão de lise, obtendo-se um volume e uma concentração final de 1mL de tampão de lise e 2 μL de inibidor de protease por amostra. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, resultando em um precipitado “impuro”, o qual foi descartado, e em um sobrenadante contendo as

proteínas extraídas. Este sobrenadante foi retirado e armazenado em microtubos de 1,0 mL a -80°C.

A concentração de proteínas nas amostras foi mensurada a partir da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), indicada para a detecção e quantificação de proteínas solubilizada, que consiste na quantificação de proteínas totais com a utilização do corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250, e é baseada na interação deste com os aminoácidos das cadeias laterais básicas e aromáticas das proteínas (ZAIA *et al.*, 1998) utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) e leitura de absorbância a 595nm. A partir da concentração obtida com esta técnica, estimou-se o quanto de amostra deveria ser aplicada na eletroforese do gel 2D.

Primeira Separação Proteica

Reidratação das tiras de gel (*Strips*)

Neste estudo foram utilizadas tiras de IPG (*immobilized pH gel*) (*strips*) na faixa de pH de 4-7 não-linear (130 x 3 x 0,5 mm; GE *Healthcare*). A primeira etapa consistiu na reidratação das tiras juntamente com a amostra. Para tal foi utilizado um suporte de acrílico com 12 canaletas (*Immobiline Dry Strip Reswelling Tray* - *Amersham Bioscience*), onde um mix contendo tampão de reidratação (7M de ureia, 2M de tioureia e 2% de CHAPS) (adaptado de 2-D *Electrophoresis Principles and Methods* - GE *Healthcare*, 2004), DTT, IPG *buffer* e a amostra foram aplicados diretamente sobre a placa. As tiras foram colocadas com a superfície do gel virada para baixo em contato com a mistura, e, em seguida, cobertas com de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid* - GE *Healthcare*), evitando que a ureia se cristalice e as tiras sequem, o que limita o risco de contaminar as amostras. O período de reidratação foi de 18 horas e 30 minutos, em temperatura ambiente.

Focalização Isoelétrica (IEF)

Após o processo de reidratação, deu-se início a Focalização Isoelétrica (primeira dimensão), que foi realizada a fim de separar as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). Uma placa de cerâmica foi utilizada nesta fase, também com 12 canaletas (*Manifold* - GE Healthcare). As tiras foram transferidas do suporte de acrílico para a placa de cerâmica, com a porção em gel voltada para cima, onde foi acrescentado *DryStrip Cover Fluid* em todas as canaletas, mesmo aquelas que não continham as tiras, para que elas não fossem danificadas. Em seguida, foram associados dois eletrodos, ambos em contato com as tiras, um na parte superior e o outro na parte inferior, que permitiu a passagem da corrente elétrica. A IEF foi realizada no sistema de eletroforese *Ettan IPGphor II* (*Amersham Bioscience*), com o programa específico para a tira de 13cm, pH 4-7 não linear (Tabela 1).

Fase	Voltagem (V)	Tempo
1	500	1:00h
2	1000	1:00h
3	8000	2:30h
4	8000	0:30h

QUADRO 5 -- Programa para o *Ettan Ipgphor II* (tira de 13 cm, pH 4-7 Não Linear).

FONTE: O autor, 2013.

Equilíbrio das tiras

Após a focalização isoelétrica (primeira dimensão) as tiras foram equilibradas por duas vezes, num tempo de 30 minutos cada, antes da corrida da segunda dimensão. A primeira foi realizada com tampão de equilíbrio (50mM de Tris-HCl – pH 8,8; 6M de ureia, 30% de glicerol e 2% de SDS) acrescido de 100 mg DTT para cada duas tiras (agente redutor), adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). Na

segunda, as tiras foram ajustadas com o tampão de equilíbrio e de 400mg iodoacetamida para cada duas tiras, prevenindo sua reoxidação durante a eletroforese, o que poderia resultar em traços e artefatos no gel. Em cada uma das etapas foi adicionado 5mL da solução para cada tira.

Segunda Separação Proteica

Preparação do Gel 2D e corrida eletroforética (2D-SDS-PAGE)

Para a segunda dimensão foi utilizado um gel de poliacrilamida a 10% (água *milli-Q*, 30% de mistura de acrilamida/bis-acrilamida, 1,5M Tris - pH 8,8; 10% SDS; 10% de persulfato de amônio e TEMED) num volume final de 40mL. A tira de IPG foi colocada no topo do gel (com a superfície de plástico em contato com a placa de vidro) e selada com uma solução de agarose (agarose 0,5%, tampão de corrida e Azul de Bromofenol) para prevenir o ressecamento. Marcadores de massa molecular (LMW) entre 14 e 97 kDA (*GE Healthcare*) foram aplicados em papel filtro e posicionados sobre o gel à esquerda da tira. A 2ª dimensão foi realizada em cuba de eletroforese *Ruby* (*GE Healthcare*) sob temperatura ajustada (11°C) e com o programa para a corrida de 15mA/gel por 30 minutos, seguida de 30mA/gel por um período que variou entre 4 e 7 horas. A corrida foi interrompida quando a linha de migração esteve aproximadamente a 1cm do final do gel 2D. Ao final, obteve-se um gel contendo diversos “spots” dispersos, cada um correspondendo, em sua maioria, a uma proteína em particular.

Fixação

Após a corrida os géis foram fixados durante 1 hora sob leve agitação em solução contendo 100mL de metanol, 7,6mL de ácido orto-fosfórico 85% e água destilada. O ácido orto-fosfórico aumenta a força das interações hidrofóbicas entre a proteína e o corante.

Coloração

Na sequência, o gel 2D foi corado com Coomassie coloidal (G-250) que detecta até 100ng de proteínas. Foi seguido o protocolo adaptado de 2-D *Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). Após a fixação os géis foram corados por 16 horas com solução de azul de Coomassie. Depois, foram descorados com água destilada. Ao final, foram armazenados em solução de ácido acético 1% em temperatura de 4°C.

Digitalização e Análise das imagens

Os géis 2D foram digitalizados pelo equipamento *ImageScanner™ II* (GE Healthcare) e a análise das imagens realizadas pelo *software ImageMaste™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Este sistema permite a contagem do número de *spots*, a caracterização automática dos valores de pI e massa molecular, bem como a utilização de recursos para o melhoramento na qualidade das imagens (ROCHA *et al.*, 2005).

Os parâmetros utilizados no programa para identificação dos *spots* foram: *min area* – 5; *smooth* – 3; e *saliency* – 25, onde *min área* reduz artefatos, *smooth* elimina os ruídos do *spot* e define a resolução em sobreposições, *saliency* delimita a curvatura do *spot*. Os *spots* foram identificados automaticamente pelo programa e depois conferidos manualmente.

A primeira análise consistiu no pareamento (*matching*) dentro de uma mesma replicata (apenas tumor – triplicatas/duplicatas e apenas linfonodos – triplicatas/duplicatas). Após esta análise inicial, os tecidos foram comparados, tumor *versus* linfonodo e linfonodo *versus* tumor, a fim de se verificar quais bandas estavam expressas apenas em um tecido e não expressa no outro tecido. Para que o pareamento fosse realizado de maneira correta, foram escolhidos dois pontos de referências existentes nos géis (*landmarks*). Os resultados do pareamento foram conferidos manualmente um por um.

Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *t* de *Student*, considerando como bandas diferencialmente expressas as que apresentassem uma variação estatística significativa ($0,02 < p < 0,05$).

Identificação das proteínas

Os *spots* de interesse identificados na etapa anterior foram manualmente excisados dos géis com o auxílio de ponteiros estéreis e descorados por uma hora, em tubos eppendorf 0,5mL contendo 400µL de solução de acetonitrila 50% e 25mM de bicarbonato de amônio (AMBIC 0,5M). Este procedimento foi repetido três vezes até a completa retirada do corante. Em seguida, os *spots* foram submetidos a duas etapas de desidratação por 5 minutos cada em 200µL de acetonitrila 100%. Após a remoção da acetonitrila, os *spots* foram deixados em temperatura ambiente para secagem.

Na digestão proteolítica, a solução de uso de tripsina foi feita utilizando-se tripsina estoque previamente preparada (100µg de tripsina - *Sequencing Grade Modified Trypsin* - *Promega* - em 100µL de solução de ácido acético 50mM, com alíquotas de 10µL em uma concentração de 100x) juntamente com tampão de enzima (para a preparação de 1mL – 40µL de AMBIC 40mM; 100µL de acetonitrila 100% e 860µL de água *mili-Q*). A proporção foi de 1µL de tripsina e 99µL de tampão de enzima. Em cada *spot* foi adicionado 20µL desta solução final. Esta etapa foi realizada em banho de gelo e assim permaneceu durante 30 minutos após a adição de tripsina para que sua ação fosse interrompida e ao começar fosse iniciada em todos os *spots* simultaneamente.

Após este período, os microtubos foram colocados em uma estufa a 37°C por 18 horas, período no qual ocorreu a digestão.

Posteriormente, a solução foi misturada a 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoracético saturada com matriz de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico) na proporção 1:1. Ao volume final de 2µl, foi aplicada a placa para MALDI 1µl desta solução final (*scout MTP MALDI ion source 384 target* – *Bruker Daltonics*).

Concentração proteica com *speed vac*

Após a digestão, os peptídeos foram concentrados, no intuito de se melhorar a identificação dos mesmos.

A concentração é realizada utilizando uma solução contendo TFA (ácido trifluoracético) 5% e acetonitrila 50%. Tubos eppendorf de 0,2mL foram nomeados com a mesma identificação dos tubos contendo os peptídeos a ser concentrados.

A solução existente nos primeiros tubos foi retirada e colocada nos tubos renomeados, e 20µL da solução de concentração foi colocada nos tubos antes contendo os peptídeos. Esses foram agitados por 30 minutos. Após isso, retirou-se a solução e esta foi colocada no segundo tubo. O procedimento foi realizado uma segunda vez, totalizando 60µL de solução nos segundo tubos.

Após isso, realizou-se uma centrifugação no *speed vac* durante 30 minutos. Por fim, os peptídeos foram aspirados e expelidos com TFA 0,1%.

Purificação Peptídica

Alguns *spots* que não apresentaram identificação foram submetidos à purificação de peptídeos, após o processo de concentração. Para tal, foi utilizada uma ponteira com uma coluna de fase reversa (*PerfectPure C-18 Tip* - Eppendorf). O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A ativação do carbono existente na ponteira foi realizada utilizando-se 10µl de solução contendo TFA 2,5%, acetonitrila 100% e água Mili-Q por duas vezes, em seguida foi realizada uma lavagem com uma solução de equilíbrio (TFA 0,1%) contendo TFA 2,5% e água Mili-Q também por duas vezes. Após esta ativação, a amostra foi aspirada e expelida cerca de dez vezes, sempre evitando a passagem de ar pela coluna de fase reversa. A ponteira foi novamente lavada em solução de TFA 0,1% para retirada dos contaminantes. Os peptídeos foram eluídos diretamente em tubo eppendorf 0,2ml contendo 3µl de solução de acetonitrila 100%, ácido trifluoracético 2,5% e água *Mili-Q*. A solução foi aspirada e expelida por 5 vezes. Após isso, 1µL da

solução de eluição foi misturada a 1µL da matriz HCCA e aplicados na placa para o MALDI.

Identificação e análise dos espectros de massas

A análise dos fragmentos proteicos foi realizada pela espectrometria de massa com base na dessorção/ionização das proteínas com laser auxiliado por uma matriz, que analisa o conteúdo através do tempo de voo dos íons no tubo de análise. O programa de computador utilizado foi o *FlexControl 2.0* (*Bruker Daltonics*). A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, ACTH e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50Da e 2211,10Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa *FlexAnalysis 2.0* (*Bruker Daltonics*).

O padrão de massa obtido por PMF foi comparado com as informações existente nos bancos de dados do MASCOT onde foi possível a identificação das proteínas.

Os parâmetros utilizados no MASCOT foram: enzima tripsina, *Database SwissProt*, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa, que consistem em modificações ocorridas no gel em decorrências dos reagentes nele existentes, e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância de erro utilizada foi de no máximo 200 partes por milhão (ppm).

Os nomes e siglas utilizados para as proteínas foram obtidos no banco de dados UniprotKB.

APÊNDICE 2

TABELA 1 - Proteínas identificadas dados referentes aos critérios de identificação.

Proteína (SIGLA)	Identificação no gel	Código UniprotKB ^a	MASCOT score / 2º score ^b	MM (kDa) / pI teóricos ^c	MM (kDa) / pI observados	Δ MM% / Δ Pi ^d	Cobertura de sequência%	Nº / peptídeos sobrepostos
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS								
Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	1	P60709 P63261	145 / 40	42,052 / 5,29 42,108 / 5,31	45.000 / 5.25	7,0 / 0,04 6,9 / 0,06	30	11 / 09
	2	P60709 P63261	107 / 56	42.052 / 5.29 42.108 / 5.31	56.000 / 5.46	26,0 / 0,17 26,0 / 0,17	25	12 / 08
Proteína heat shock beta-1 (HSPB1)	3	P04792	105 / 27	22.826 / 5.98	28.000 / 5,51	22,7 / 0,46	28	13 / 07
	4		98 / 36		27.000 / 6.30	18,3 / 0,32	37	10 / 06
	5		124 / 28		29.000 / 6.71	27,0 / 0,74	46	22 / 08
	6		115 / 33		29.000 / 5.97	27,0 / 0,01	40	22 / 08
Queratina do citoesqueleto 19 - tipo 1 (K1C19)	7	P08727	79 / 31	44.079 / 5.04	42.000 / 4.81	4,7 / 0,23	13	08 / 06
	8		140 / 40		43.000 / 4.74	2,4 / 0,3	25	17 / 11
Queratina do citoesqueleto - tipo 2 (K2C7)	9	P08729	102 / 27	51.411 / 5.40	50.000 / 4.71	2,7 / 0,69	25	24 / 11
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	10	P52565	101 / 35	23.250 / 5.02	28.000 / 5.01	20,4 / 0,01	29	08 / 06
Proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP)	11	P13693	65 / 34	19.697 / 4.84	26.000 / 4.74	32,0 / 0,09	18	06 / 04

Cadeia beta da tubulina (TBB5)		P07437		50.095 / 4.78		18,2 / 0,27		
Cadeia beta-4A da tubulina (TBB4A)	12	P04350	64 / 48	50.010 / 4.78	41.000 / 5.05	18,0 / 0,27	11	09 / 05
Cadeia beta-4B da tubulina (TBB4B)		P68371		50.255 / 5.79		18,4 / 0,74		
Vimentina (VIME)	13	P08670	213 / 46	53.676 / 5.06	54.000 / 5.21	0,6 / 0,15	48	33 / 21
	14		70 / 18		52.000 / 4.74	3,1 / 0,32	23	14 / 07
	15		93 / 33		50.000 / 4.78	6,8 / 0,27	24	20 / 09
	16		158 / 33		40,000 / 4,68	25,5 / 0,38	24	20 / 14
	17		182 / 36		41,000 / 4,68	23,6 / 0,37	30	16 / 15
	18		152 / 29		30.000 / 5.23	44,1 / 0,17	37	20 / 13
	19		142 / 40		46,000 / 4,91	14,3 / 0,14	21	13 / 11
	20		92 / 43		55.000 / 5.26	2,5 / 0,21	22	10 / 07
CRESCIMENTO CELULAR E REGULADORES DE PROLIFERAÇÃO								
Proteína 14-3-3 zeta/delta (1433Z)	21	P63104	109 / 33	27.899 / 4.73	31.000 / 4.59	11,1 / 0,13	28	12 / 09
Proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1)	22	Q9NRI5	66 / 30	94.806 / 5.96	77.000 / 6.73	18,8 / 0,77	07	21 / 08
Proibitina (PHB)	23	P35232	86 / 30	29.843 / 5.57	29,000 / 5,43	2,8 / 0,13	24	09 / 06
	24		266 / 54		30.000 / 5.59	0,5 / 0,03	54	17 / 14
	25		218 / 40		27.000 / 6.74	9,5 / 1,17	52	20 / 14
Triptofano-tRNA ligase (SYWC)	26	P23381	76 / 30	53.474 / 5.83	61.000 / 6.1868	14,1 / 0,36	10	09 / 06

PROTEÍNAS COM FUNÇÕES DE LIGAÇÃO / TRANSPORTE

Proteína de ligação NSF solúvel - alfa (SNAA)	27	P54920	112 / 28	33.667 / 5.23	36.000 / 5.23	6,9 / 0,01	28	11 / 08
Proteína selênio-ligante (SBP1)	28	Q13228	126 / 34	52.928 / 5.93	62.000 / 6.32	17,1 / 0,4	17	08 / 08
Serotransferrina (TRFE)	29	P02787	168 / 43	79.294 / 6.81	41.000/ 4.60	48,3 / 2,21	27	25 / 18
Albumina sérica (ALBU)	30	P02768	62 / 29	71.317 / 5.92	59.000 / 5.79	17,3 / 0,12	10	10 / 06
Ligante de vitamina D (VTDB)	31	P02774	93 / 37	54.526 / 5.40	57.000 / 5,31	4,5 / 0,09	20	09 / 07

PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MEMBRANA COM MÚLTIPLAS ATIVIDADES

Anexina A1 (ANXA1)	32	P04083	105 / 22	38.918 / 6.57	38.000 / 6.80	2,4 / 0,24	30	18 / 09
Proteína tipo fosfoglucomutase 5 (PGM5)	33	Q15124	57 / 40	62.756 / 6.81	59.000 / 5.52	6,0 / 1,29	11	09 / 05
Prelamina-A/C (LMNA)	34	P02545	68 / 34	74.380 / 6.57	61.000 / 6.89	18,0 / 0,33	11	08 / 06

ENZIMAS METABÓLICAS

Aminoacilase-1 (ACY1)	35	Q03154	160 / 45	46.084 / 5.77	43.000 / 6,15	6,7 / 0,39	20	10 / 10
Isomerase Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA (ECH1)	36	Q13011	70 / 46	36.136 / 8.16	34.000 / 6.49	5,9 / 1,66	11	04 / 04

DEGRADAÇÃO PROTÉICA

Subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5)	37	P28066	78 / 37	26.565 / 4.74	28.000 / 4.68	5,4 / 0,06	24	04 / 04
DETOXIFICAÇÃO E PROTEÍNAS REDOX								
Glutathione S-transferase Omega-1 (GSTO1)	38	P78417	72 / 35	27.833 / 6.23	31.000 / 5.92	11,4 / 0,3	19	04 / 04
Peroxirredoxina-4 (PRDX4)	39	Q13162	75 / 26	30.749 / 5.86	29.000 / 5,81	5,7 / 0,04	21	09 / 05
CHAPERONAS MOLECULARES								
Endoplasmína (ENPL)	40	P14625	78 / 41	92.696 / 4.76	64.000 / 4.69	31,0 / 0,06	7	08 / 07
OUTRAS FUNÇÕES								
Cadeia leve da ferritina (FRIL)	41	P02792	141 / 37	20.064 / 5.51	21.000 / 5.66	4,7 / 0,16	46	13 / 10
Proteína heme-ligante 2 (HEBP2)	42	Q9Y5Z4	86 / 29	22.861 / 4.58	31.000/ 4.41	35,6 / 0,17	26	07 / 05
Proteína SOGA1 (SOGA1)	43	O94964	58 / 33	161.201 / 6.08	48,000 / 6,24	70,2 / 0,16	6	30 / 11
Proteína homóloga slowmo 2 (SLMO2)	44	Q9Y3B1	57 / 33	21.481 / 6.24	31.000 / 4.6633	44,3 / 1,58	36	11 / 04

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no UniprotKB; ^{b, c} valor obtido no MASCOT; ^d Valores obtidos de $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$ (Dupont *et al.*, 2005); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico.

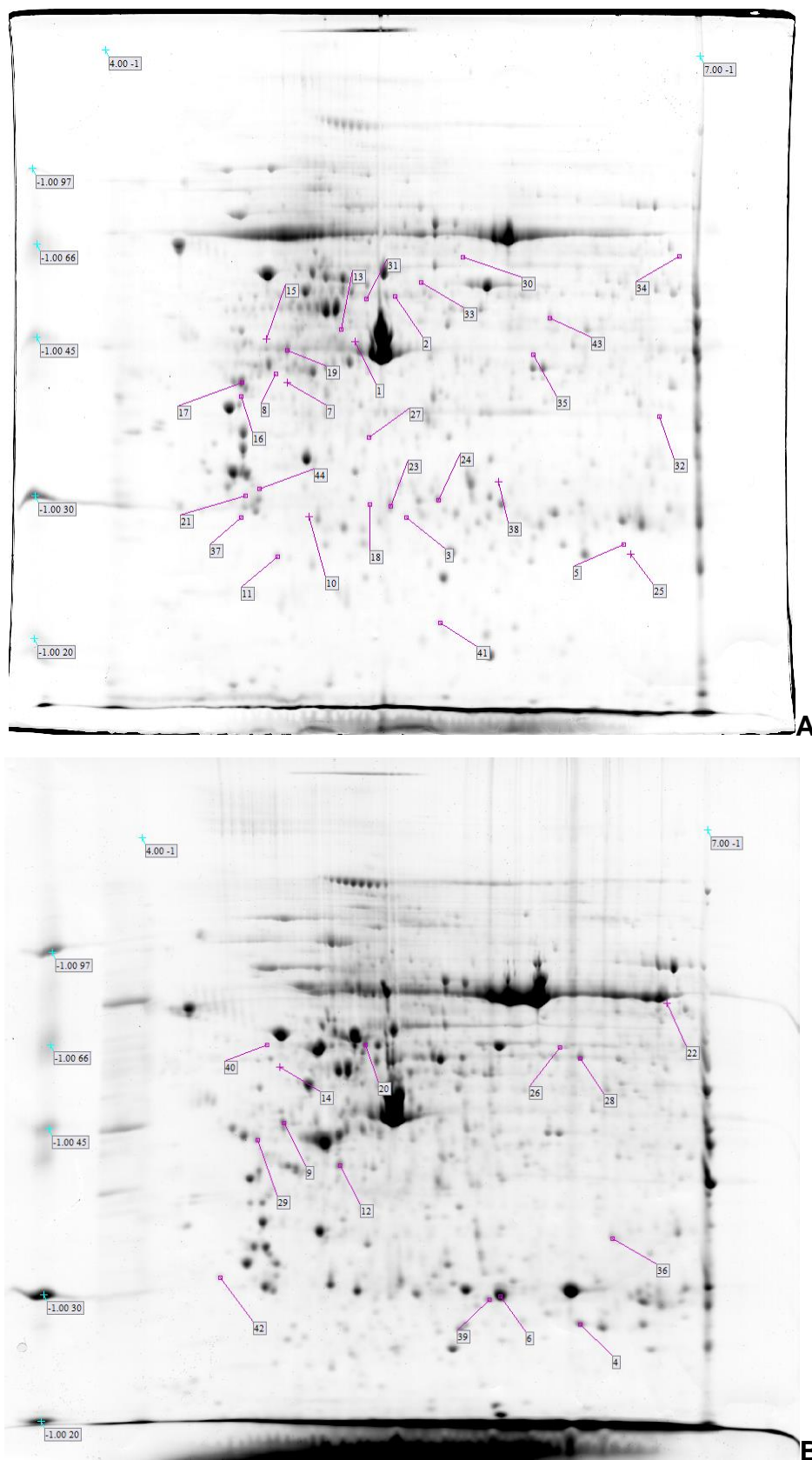


FIGURA 10 - Gel Bidimensional das amostras de referência CP 641T (A) e CP 645L (B) indicando a localização dos *spots* identificados. Indicado as variantes de MM e pl.
 FONTE: O autor, 2013.

APÊNDICE 3

TABELA 2 - Proteínas identificadas e dados referentes aos critérios de identificação ($0,02 < p < 0,05$).

Proteína (SIGLA)	ID	Código <i>UniprotKB</i> ^a	MASCOT score / 2º score	MM (kDa) / pI teóricos	MM (kDa) / pI observados	Δ MM% / Δ Pi	Cobertura de sequência%	Nº / peptídeos sobrepostos
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS								
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	1	P60709	145 / 40	42.052 / 5.29	45.000/ 5.2521	7,0 / 0,04	30	11 / 09
Actina citoplasmática 2 (ACTG)		P63261					30	11 / 09
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	2	P60709	107 / 56	42.052 / 5.29	56.000/ 5.4609	26,0 / 0,17	25	12 / 08
Actina citoplasmática 2 (ACTG)		P63261					25	12 / 08
Proteína heat shock beta-1 (HSPB1)	3	P04792	105 / 27	22.826 / 5.98	28.000 / 5.5163	22,7 / 0,46	28	13 / 07
	4		98 / 36		27.000 / 6.3040	18,3 / 0,32	37	10 / 06
	5		124 / 28		29.000 / 6.7162	27,0 / 0,74	46	22 / 08
	6		115 / 33		29.000 / 5.9700	27,0 / 0,01	40	22 / 08
Queratina do citoesqueleto 19 - tipo 1 (K1C19)	7	P08727	79 / 31	44.079/5.04	42.000/ 4.8127	4,7 / 0,23	13	08 / 06
	8		140 / 40		43.000/ 4.7410	2,4 / 0,3	25	17 / 11
Queratina do citoesqueleto - tipo 2 (K2C7)	9	P08729	102 / 27	51.411/5.40	50.000/4.7140	2,7 / 0,69	25	24 / 11
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	10	P52565	101 / 35	23.250 / 5.02	28.000/ 5.0111	20,4 / 0,01	29	08 / 06
Proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP)	11	P13693	65 / 34	19.697/4.84	26.000/4.7470	32,0 / 0,09	18	06 / 04

Vimentina (VIME)	15	P08670	93 / 33	53.676/ 5.06	50.000/ 4.7878	6,8 / 0,27	24	20 / 09
	16		158 / 33		40,000/ 4,6845	25,5 / 0,38	24	20 / 14
	17	P08670	182 / 36	53.676/ 5.06	41,000/ 4,6864	23,6 / 0,37	30	16 / 15
	18		152 / 29		30.000 / 5.2331	44,1 / 0,17	37	20 / 13
	19	142 / 40	46,000/ 4,9178		14,3 / 0,14	21	13 / 11	
	20		92 / 43		55.000 / 5.2668	2,5 / 0,21	22	10 / 07
CRESCIMENTO CELULAR E REGULADORES DE PROLIFERAÇÃO								
Proteína 14-3-3 zeta/delta (1433Z)	21	P63104	109 / 33	27.899 / 4.73	31.000 / 4.5956	11,1 / 0,13	28	12 / 09
Proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1)	22	Q9NRI5	66 / 30	94.806 / 5.96	77.000 / 6.7324	18,8 / 0,77	7	21 / 08
Proibitina (PHB)	24	P35232	266 / 54	29.843 / 5.57	30.000 / 5.5956	0,5 / 0,03	54	17 / 14
	25		218 / 40		27.000 / 6.7435	9,5 / 1,17	52	20 / 14
PROTEÍNAS COM FUNÇÕES DE LIGAÇÃO / TRANSPORTE								
Proteína de ligação solúvel NSF alfa (SNAA)	27	P54920	112 / 28	33.667 / 5.23	36.000 / 5.2371	6,9 / 0,01	28	11 / 08
Albumina sérica (ALBU)	30	P02768	62 / 29	71.317 / 5.92	59.000 / 5.7992	17,3 / 0,12	10	10 / 06

Ligante de Vitamina D (VTDB)	31	P02774	93 / 37	54.526 / 5.40	57.000 / 5.3136	4,5 / 0,09	20	09 / 07
PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MEMBRANA COM MÚLTIPLAS ATIVIDADES								
Anexina A1 (ANXA1)	32	P04083	105 / 22	38.918 / 6.57	38.000 / 6.8088	2,4 / 0,24	30	18 / 09
Proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5)	33	Q15124	57/40	62.756/6.81	59.000 / 5.5219	6,0 / 1,29	11	09 / 05
Prelamina-A/C (LMNA)	34	P02545	68 / 34	74.380 / 6.57	61.000 / 6.8987	18,0 / 0,33	11	08 / 06
ENZIMAS METABÓLICAS								
Aminoacilase-1 (ACY1)	35	Q03154	160 / 45	46.084 / 5.77	43.000 / 6,1587	6,7 / 0,39	20	10 / 10
DEGRADAÇÃO PROTÉICA								
Subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5)	37	P28066	78 / 37	26.565 / 4.74	28.000 / 4.6834	5,4 / 0,06	24	04 / 04
DETOXIFICAÇÃO E PROTEÍNAS REDOX								
Glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1)	38	P78417	72 / 35	27.833 / 6.23	31.000 / 5.9283	11,4 / 0,3	19	04 / 04
CHAPERONAS MOLECULARES								
Endoplasmina (ENPL)	40	P14625	78 / 41	92.696 / 4.76	64.000 / 4.6972	31,0 / 0,06	7	08 / 07

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no UniprotKB; ^b, ^c valor obtido no MASCOT; ^d Valores obtidos de $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$ (Dupont *et al.*, 2005); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico.

APÊNDICE 4

TABELA 3 - Proteínas identificadas apenas em tumor primário.

Proteína (SIGLA)	Spot - ID	Código UniprotKB ^a	VD-CP	p<	Locus Gênico	MM (kDa) / pI observados	ΔMM% / ΔpI	Score ^b	Cobertura %
Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	CP 645T - 1	P60709	1000000		7p22		7,0 / 0,04	145 / 40	30
		P63261			17q25	45.000 / 5.25	6,9 / 0,06		
Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	CP 641T - 2	P60709	1000000		7p22		26,0 / 0,17	107 / 56	25
		P63261			17q25	56.000 / 5.46	26,0 / 0,17		
Proteína heat shock beta-1 (HSPB1)	CP 641T – 3	P04792	1000000		7q11.23	28.000 / 5.51	22,7 / 0,46	105 / 27	28
Queratina do citoesqueleto 19 - tipo 1 (K1C19)	CP 644T – 7	P08727	1000000		17q21.2	42.000 / 4.81	4,7 / 0,23	79 / 31	13
	CP 644T – 8		1000000			43.000 / 4.74	2,4 / 0,3	140 / 40	25
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	CP 645T - 10	P52565	1000000		17q25.3	28.000 / 5.0111	20,4 / 0,01	101 / 35	29
Vimentina (VIME)	CP 630T – 15	P08670	1000000		10p13	50.000 / 4.78	6,8 / 0,27	93 / 33	24
	CP 641T – 16		1000000			40.000 / 4.68	25,5 / 0,38	158 / 33	24
	CP 641T – 17		1000000			41.0000 / 4.68	23,6 / 0,37	182 / 36	30

	CP 641T - 19		1000000		46.000 / 4.91	14,3 / 0,14	142 / 40	21
Proibitina (PHB)	CP 622T - 25	P35232	1000000	17q12-q21	27.000 / 6.74	9,5 / 1,17	218 / 40	52
Ligante de Vitamina D (VTDB)	CP 641T - 31	P02774	1000000	4q12-q13	57.0000 / 5.31	4,5 / 0,09	93 / 37	20
Proteína fosfoglicomutase tipo 5 (PGM5)	CP 644T - 33	Q15124	1000000	9q21.11	59.000 / 5.52	6,0 / 1,29	57 / 40	11
Prelamina-A/C (LMNA)	CP 630T - 34	P02545	1000000	1q22	61.000 / 6.89	18,0 / 0,33	68 / 34	11
Subunidade alfa do proteossomo tipo-5 (PSA5)	CP 645T - 37	P28066	1000000	1p13	28.000 / 4.68	5,4 / 0,06	78 / 37	24
Glutationa S-transferase omega-1 (GSTO1)	CP 644T - 38	P78417	1000000	10q25.1	31.000 / 5.92	11,4 / 0,3	72 / 35	19

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: a Código de acesso da proteína no UniprotKB; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o spot está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pl – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pl conforme o banco de dados Expasy; b valor obtido no MASCOT.

TABELA 4 - Proteínas identificadas apenas em linfonodo axilar metastático.

Proteína (SIGLA)	Spot - ID	Código UniprotKB ^a	VD-CP	p<	Locus Gênico	MM (kDa) / pl observados	ΔMM% / Δpl	Score ^b	Cobertura %
Proteína heat shock beta-1 (HSPB1)	CP 667L – 4	P04792	1000000		7q11.23	27.000 / 6.30	18,3 / 0,32	98 / 36	37
	CP 667L – 6		1000000			29.000 / 5.97	27,0 / 0,01	115 / 33	40

Queratina do citoesqueleto - tipo 2 (K2C7)	CP 667L – 9	P08729	1000000	12q13.13	50.000 / 4.71	2,7 / 0,69	102 / 27	25
--	-------------	--------	---------	----------	---------------	------------	----------	----

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: a Código de acesso da proteína no *UniprotKB*; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o *spot* está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pI – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pI conforme o banco de dados Expasy; b valor obtido no MASCOT.

APÊNDICE 5

TABELA 5 - Proteínas identificadas com expressão aumentada em tumor.

Proteína (SIGLA)	Spot - ID	Código UniprotKB ^a	VD-CP	p<	Locus Gênico	MM (kDa) / pl observados	ΔMM% / Δpl	Score ^b	Cobertura %
Proteína heat shock beta-1 (HSPB1)	CP 667T - 5	P04792	4,285	0,05	7q11.23	29.000 / 6.71	27,0 / 0,74	124 / 28	46
Proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP)	CP 645T - 11	P13693	2,125	0,02	13q14.13	26.000 / 4.74	32,0 / 0,09	65 / 34	18
Vimentina (VIME)	CP 644T - 18	P08670	3,437	0,05	10p13	30.000 / 5.23	44,1 / 0,17	152 / 29	37
Proteína 14-3-3 zeta/delta (1433Z)	CP 644T - 21	P63104	6,127	0,05	8q22	31.000 / 4.59	11,1 / 0,13	109 / 33	28
Proibitina (PHB)	CP 644T - 24	P35232	4,542	0,02	17q12-q21	30.000 / 5.59	0,5 / 0,03	266 / 64	54
Proteína de ligação solúvel NSF alfa (SNAA)	CP 644T - 27	P54920	4,807	0,02	19q13.33	36.000 / 5.23	6,9 / 0,01	112 / 28	28
Albumina sérica (ALBU)	CP 630T - 30	P02768	2,561	0,02	4q11-q13	59.000 / 5.79	17,3 / 0,12	62 / 29	10
Anexina A1 (ANXA1)	CP 630T - 32	P04083	4,765	0,05	9q12-q21.20	38.000 / 6.80	2,4 / 0,24	105 / 22	30
Aminoacilase-1 (ACY1)	CP 641T - 35	Q03154	4,837	0,02	3p21.1	43.000 / 6,15	6,7 / 0,39	160/45	20

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no *UniprotKB*; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o *spot* está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pl – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pl conforme o banco de dados Expasy; ^b valor obtido no MASCOT.

TABELA 6 - Proteínas identificadas com expressão aumentada em linfonodo.

Proteína (SIGLA)	Spot - ID	Código UniprotKB ^a	VD-CP	p<	Locus Gênico	MM (kDa) / pl observados	ΔMM% / Δpl	Score ^b	Cobertura %
Vimentina (VIME)	CP 622L - 20	P08670	2,398	0,05	10p13	55.000 / 5.26	2,5 / 0,21	92 / 43	22
Proteína interrompida em esquizofrenia 1 (DISC1)	CP 641L - 22	Q9NRI5	2,362	0,05	t (1;11)(q42.1;q14.3),	77.000 / 6.73	18,8 / 0,77	66/30	7
Endoplasmína (ENPL)	CP 644L - 40	P14625	4,314	0,05	12q24.2-q24.3	64.000 / 4.69	31,0 / 0,06	78/41	7

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: ^a Código de acesso da proteína no *UniprotKB*; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o *spot* está presente no gel analisado e ausente no gel comparado); MM – Massa molecular; pl – ponto isoelétrico; * dados teóricos de MM e pl conforme o banco de dados Expasy; ^b valor obtido no MASCOT.

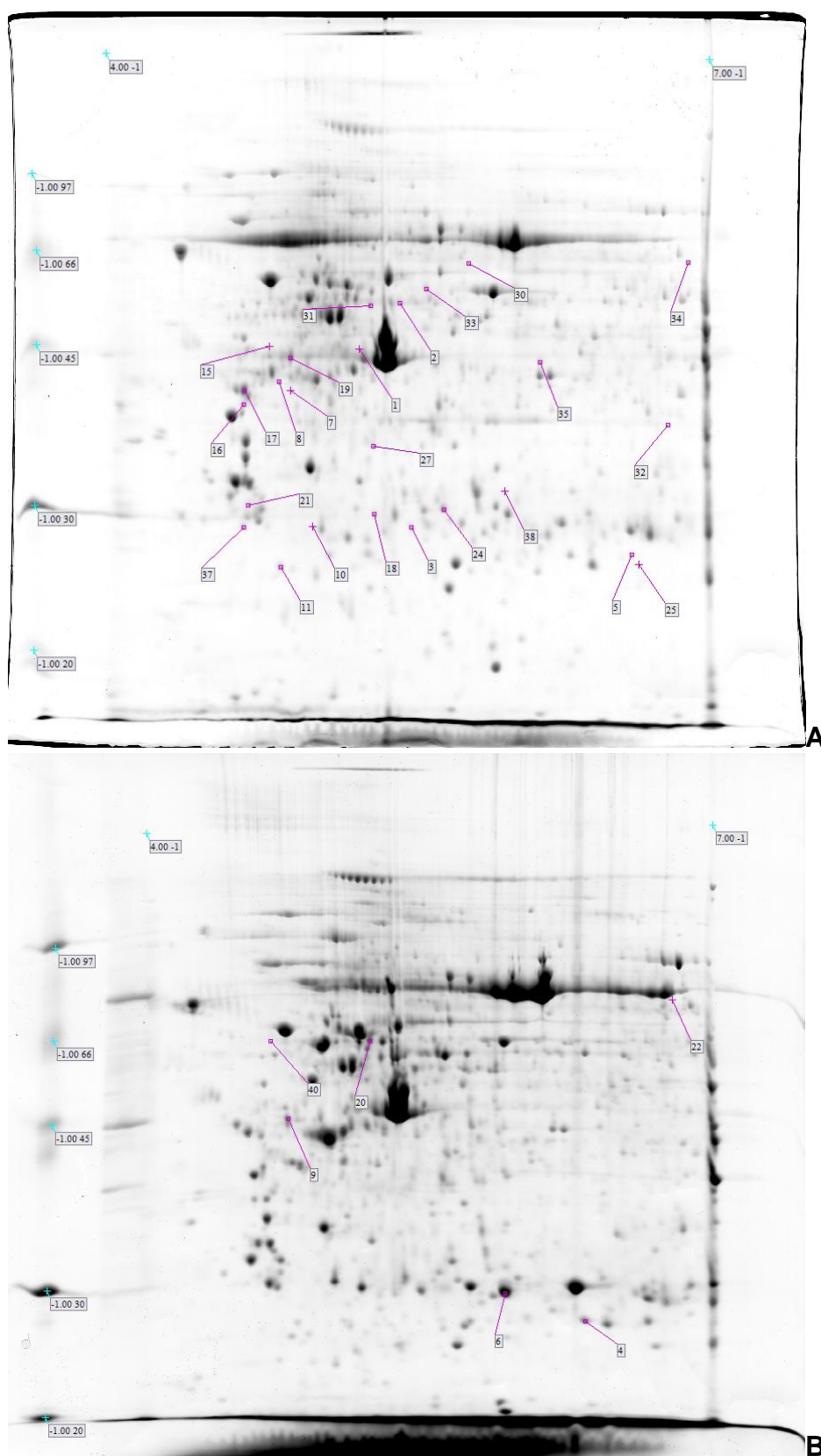


FIGURA 11 - Gel bidimensional das amostras referências CP 641T (A) e CP 645L (B) indicando a localização dos spots identificados ($0,02 < p < 0,05$).
FONTE: O autor (2013).

APÊNDICE 6

TABELA 7 - Proteínas identificadas e dados referentes aos critérios de identificação ($p < 0,02$).

Proteína (SIGLA)	ID	VD - CP	p<	MASCOT score / 2º score ^a	MM (kDa) / pI teóricos ^b	MM (kDa) / pI observados	ΔMM% / ΔPi ^c	Cobertura de sequência%	Nº / peptídeos sobrepostos
CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS									
Cadeia beta da tubulina (TBB5)	12	4,25	0,01	64 / 48	50.095 / 4.78	41.000 / 5.0500	18,2 / 0,27	11	05 / 09
Cadeia beta-4B da tubulina (TBB4B)		4,25	0,01		50.255 / 5.79		18,4 / 0,74	11	05 / 09
Cadeia beta-4A da tubulina (TBB4B)		4,25	0,01		50.010 / 4.78		18,0 / 0,27	11	05 / 09
Vimentina (VIME)	13	2,111	0,01	213 / 46	53.676 / 5.06	54.000 / 5.2142	0,6 / 0,15	48	21 / 33
	14	3,262	0,01	70 / 18		52.000 / 4.7432	3,1 / 0,32	23	07 / 14
CRESCIMENTO CELULAR E REGULADORES DE PROLIFERAÇÃO									
Proibitina (PHB)	23	7,085	0,01	86 / 30	29.843 / 5.57	29.000 / 5.4379	2,8 / 0,13	24	06 / 09
Triptofano-tRNA ligase (SYWC)	26	8,469	0,01	76 / 30	53.474 / 5.83	61.000 / 6.1868	14,1 / 0,36	10	06 / 09
PROTEÍNAS COM FUNÇÕES DE LIGAÇÃO / TRANSPORTE									
Proteína ligante de selênio 1	28	2,217	0,001	126 / 34	52.928 / 5.93	62.000 / 6.3282	17,1 / 0,4	17	08 / 08

Serotransferrina (TRFE)	29	3,159	0,001	168 / 43	79.294 / 6.81	41.000 / 4.6004	48,3 / 2,21	27	18 / 25
ENZIMAS METABÓLICAS									
Isomerase Delta (3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA (ECH1)	36	2,208	0,001	70 / 46	36.136 / 8.16	34.000 / 6.4951	5,9 / 1,66	11	04 / 04
DETOXIFICAÇÃO E PROTEÍNAS REDOX									
Peroxirredoxina-4 (PRDX4)	39	2,198	0,01	75 / 26	30.749 / 5.86	29.000 / 5,819	5,7 / 0,04	21	05 / 09
OUTRAS FUNÇÕES									
Cadeia leve da ferritina (FRIL)	41	2,438	0,001	141 / 37	20.064 / 5.51	21.000/ 5.6654	4,7 / 0,16	46	10 / 13
Proteína heme-ligante 2 (HEBP2)	42	3,454	0,001	86 / 29	22.861 / 4.58	31.000/ 4.4141	35,6 / 0,17	26	05 / 07
Proteína SOGA1 (SOGA1)	43	4,889	0,01	58 / 33	161.201 / 6.08	48,000/6,2409	70,2 / 0,16	6	11 / 30
Proteína homóloga slowmo 2 (SLMO2)	44	3,7990,01	0,01	57/33	21.481/6.24	31.000/4.6633	44,3 / 1,58	36	04 / 11

FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: ^a, ^b Código de acesso da proteína no MASCOT; ^c Valores obtidos de $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pl < 0,6$ (Dupont *et al.*, 2005); MM – Massa molecular; pl – ponto isoelétrico; VD-CP – valor de expressão diferencial (1000000 – valor dado pelo programa que indica que o *spot* está presente no gel analisado e ausente no gel comparado).

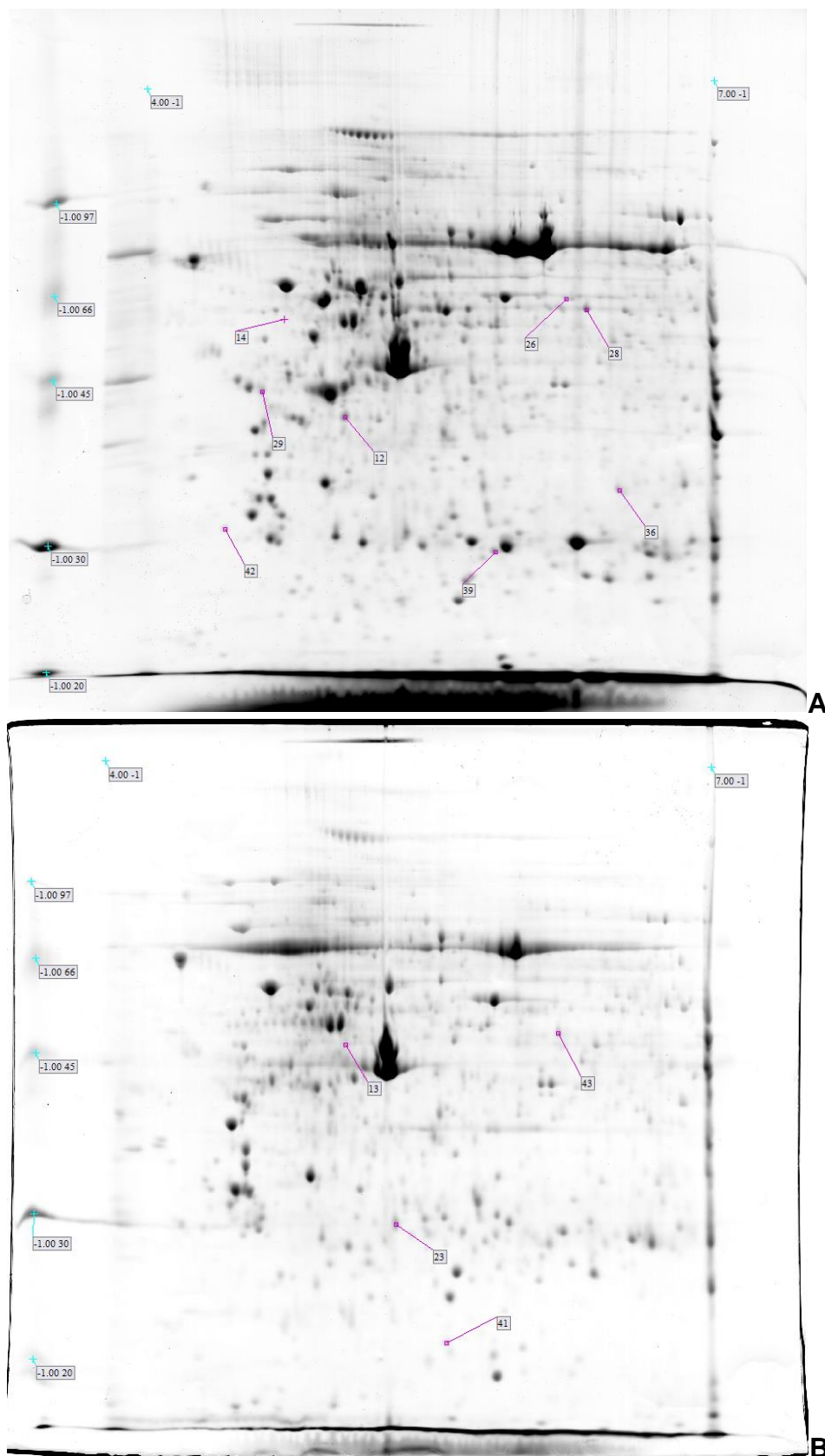


FIGURA 12 - Gel Bidimensional das amostras de referência CP 641T(A) e CP 645L (B) indicando a localização dos *spots* identificados ($p < 0,02$). Indicado as variantes de MM e pI.
 FONTE: o Autor, 2013.

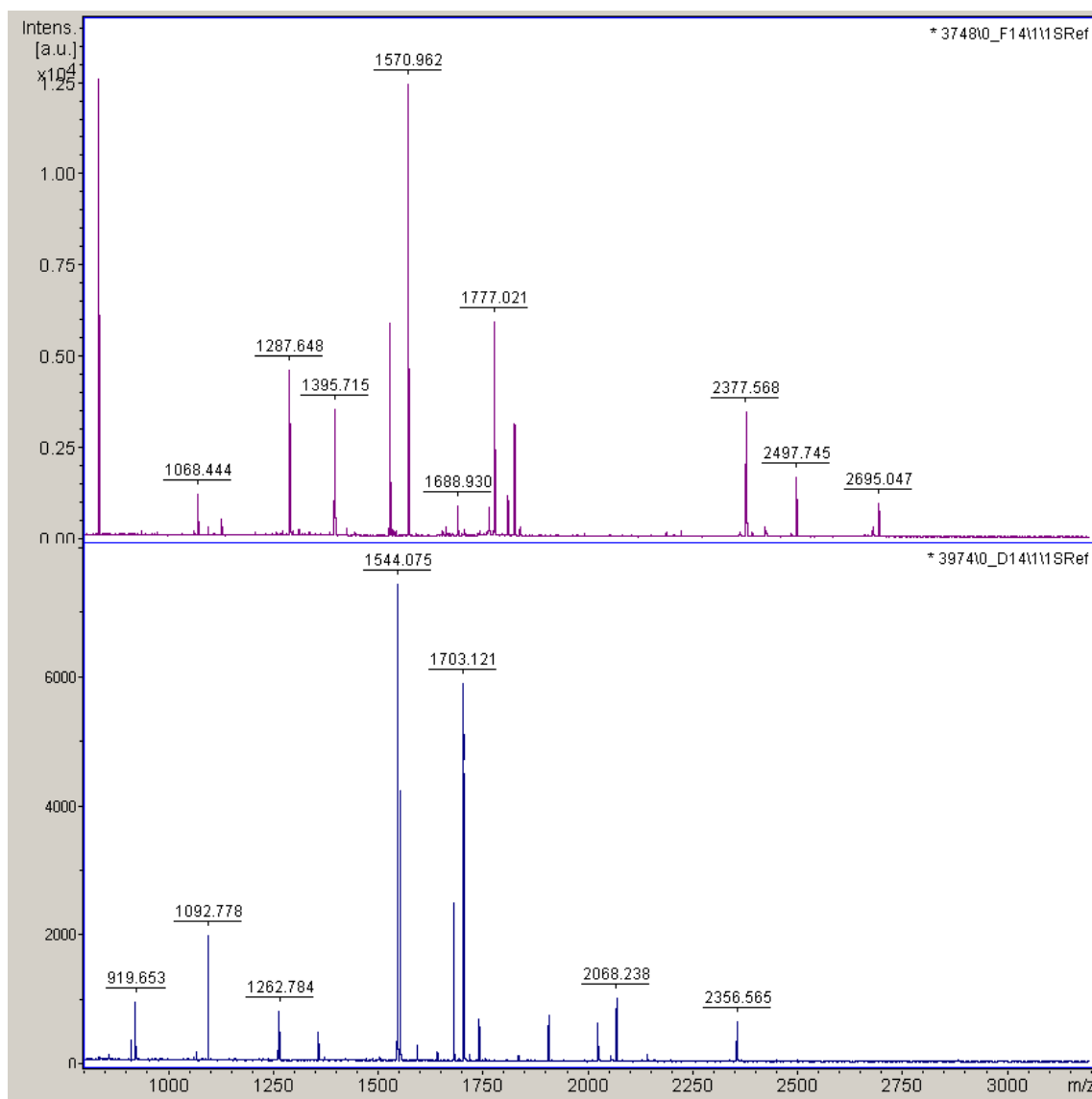


FIGURA 13 - Espectros gerados na espectrometria de massa na identificação de VIME (3748) e ANXA1 (3974) e suas respectivas massas.
FONTE: O autor, 2013.

ANEXO I

Consentimento Livre e Esclarecido

Questionário Pessoal

Por favor, leias as questões seguintes cuidadosamente e responda-as da forma mais completa e precisa possível. A informação que você der não será associada a seu nome em nenhum documento público, e ser conhecida somente pelos principais pesquisadores deste estudo. As informações que você der podem ter influência direta na interpretação dos nossos resultados, portanto, pedimos que coopere gentilmente. Fornecendo informações corretas. Obrigada pelo interesse.

Nome: _____
(Último) (Primeiro) (do meio)

A ser preenchido pelo pesquisador:

Código: _____

Data: ____/____/____

Esta folha deve ser destacada do restante do questionário e preenchida pelo pesquisador. Somente o código será usado como identificação para as páginas subsequentes. Se for necessário espaço adicional para complementar a sua resposta, escreva no verso da página e identifique a parte restante da questão com seu respectivo número.

ANEXO II

Questionário estruturado

Código nº _____

História Pessoal

1. Registro hospitalar: _____
2. Sexo: () M () F Peso atual (kg): _____ Altura: _____
3. A qual grande grupo étnico você pertence?
Negróide () Caucasóide () Asiático () Indígena () Outros ()
4. Idade: _____
5. Local de nascimento. Paraná? () Sim () Não
Se não, que região brasileira? Norte () Sul () Nordeste ()
Centro-oeste () Sudeste ()
6. Qual o seu grau instrução?
Analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º
grau incompleto () 2º grau completo () Técnico () Profissional () superior
()

Histórico de moradia

7. Qual o tipo de construção onde você morou mais tempo?
Alvenaria () Madeira () Barro () Mista ()
8. Que tipo de cobertura tinha essa moradia?

Telha barro comum () Laje () Folha de zinco () Brasilit-eternit ()
 Sapé () Outro () Qual? _____

Histórico de exposição relacionada ou não ao trabalho

9. Qual a atividade profissional que exerceu ou exerce? Há quanto tempo?

10. Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi _____

Derivados de petróleo (querosene, gasolina,...)	Sim () Não ()
Tintas/corantes	Sim () Não ()
Indústrias têxteis ou tecelagem	Sim () Não ()
Praguicida/herbicidas	Sim () Não ()
Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...)	Sim () Não ()
Processamento de madeira	Sim () Não ()
Papel ou celulose	Sim () Não ()
Mineração	Sim () Não ()
Fábrica de sapatos ou curtume	Sim () Não ()
Metalúrgica	Sim () Não ()
Usina de açúcar ou álcool	Sim () Não ()
Plástico ou borracha	Sim () Não ()
Outras substância químicas	Sim () Não ()

11. Se SIM para a pergunta acima, você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas (Máscaras, luvas, óculos,...) Sim () Não ()

12. Você fuma atualmente? () Sim () Não

13. Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?

0-5 anos () 5-10 () > 10 ()

14. Quanto você fuma/fumava por dia?

Menos de meio maço () de meio a 1 maço ()
mais de 1 maço () Quantos? _____

15. Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fuma?

Sim () Não ()

Histórico de Etilismo

16. Você consome/consumiu bebidas alcóolicas com frequência?

() Sim () Não

17. Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

0-5 anos () 5-10 anos () mais de 10 anos ()

18. Que tipo de bebida alcóolica você costuma/costumava consumir?

Destilada () Não-destilada () Outra ()

19. Quanto você costuma/costumava beber por semana?

No máximo um copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 copos ()
de 11 a 30 copos () Mais de 30 copos ()

20. Durante sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

Sim () Não ()

Histórico de Saúde

21. Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, anti-histamínicos, sedativos, ou outras drogas?

Sim () Não ()

22. Você se submeteu a algum Raio-X?

Sim () Não ()

23. Se SIM, quantos?

() Menos de 10 () Mais de 10 Local: _____

24. Você tem ou já teve as seguintes doenças?

Pressão alta () Diabetes () Tuberculose () Câncer ()

25. Em casos de câncer na família, qual era o parentesco?

Pai () Mãe () Irmão () Filho () Tio () Primo () Outro ()

26. Qual era a localização do tumor?

Boca/garganta () Pulmão () Estômago () Intestino ()

Ginecológico () Mama () Outro () Qual? _____

27. Você já teve alguma moléstia venérea?

Sim () Qual? _____ Não ()

Histórico hormonal e reprodutivo

28. Idade da primeira menstruação (menarca): _____

29. Idade da última menstruação (menopausa): _____

30. Sua menstruação é/era () Regular () Irregular

31. Teve abortos espontâneos? () Sim Quantos? _____ Não ()

32. Teve filhos? () Sim Quantos? _____ () Não

33. Qual a sua idade quando teve o primeiro filho?

34. Usou/usa pílulas anticoncepcionais? () sim Quanto tempo?_____

35. Faz/fez reposição hormonal? _____

Marcadores tumorais

ERBB2:_____

TP53:_____

REP:_____

Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histopatológico):
